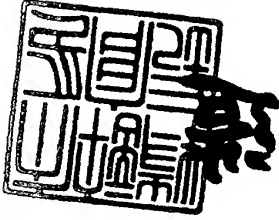


出証番号 出証特 2000-3066657



及川耕三

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

2000年 8月25日

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

PRIORITY  
DOCUMENT

小関 良宏  
三栄源エフ・エフ・アイ株式会社

特願 2000-175825

2000年 6月12日

出願人  
Applicant(s):

出願番号  
Application Number:

出願年月日  
Date of Application:

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。  
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

JAPANESE GOVERNMENT  
PATENT OFFICE

日本国特許庁

JF00/4837

WIPO  
REC'D 12 SEP 2000  
PCT

19.07.00

PCT/JP00/04837

JF00/4837

【書類名】	特許願
【整理番号】	14200JP
【提出日】	平成12年 6月12日
【あて先】	特許庁長官 殿
【国際特許分類】	C12N 15/09 A01H 5/00 C12N 5/14
【発明者】	東京都府中市緑町2-6-1-1007
【氏名】	小柳 美喜子
【発明者】	神奈川県相模原市上溝612-8
【氏名】	福田 崇
【発明者】	東京都東久留米市大門町2-3-6-302
【氏名】	小関 良宏
【発明者】	大阪府豊中市三和町1丁目1番11号 三栄源エフ・エ
【氏名】	香田 隆俊
【特許出願人】	
【識別番号】	599101760
【氏名又は名称】	小関 良宏
【特許出願人】	
【識別番号】	000175283
【氏名又は名称】	三栄源エフ・エフ・フイ株式会社
【代理人】	
【識別番号】	100065215
【弁理士】	

【氏名又は名称】 三枝 英二  
【電話番号】 06-6203-0941  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100076510  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 掛樋 悠路  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100086427  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 小原 健志  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100090066  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 中川 博司  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100094101  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 館 泰光  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100099988  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 斎藤 健治  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100105821  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 藤井 淳  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100099911  
【弁理士】

【氏名又は名称】 関 仁士

【選任した代理人】

【識別番号】 100108084

【弁理士】

【氏名又は名称】 中野 睦子

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第206320号

【出願日】 平成11年 7月21日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001616

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9708179

【フロップの要否】 要

様因子をコードするDNA

イヌし、かつゲノム遺伝子の挿入位置においてTAの重複を引き起こすMIT E  
(d) (c) の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダ

(c) 配列番号2の塩基配列からなるDNA

下記(c)又は(d)のDNAからなるMIT E様因子:

の整数]の重複を引き起こすMIT E様因子をコードするDNA、及び

イヌし、かつゲノム遺伝子の挿入位置において(A) n G (A) n [nは1以上  
(b) (a) の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダ

(a) 配列番号1の塩基配列からなるDNA

E様因子:

【請求項4】可動性因子が、下記(a)又は(b)のDNAからなるMIT

の少なくとも1種である、請求項2記載の転写活性化因子。

様因子をコードするDNA

イヌし、かつゲノム遺伝子の挿入位置においてTAの重複を引き起こすMIT E  
(d) (c) の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダ

(c) 配列番号2の塩基配列からなるDNA

下記(c)又は(d)のDNAからなるMIT E様因子:

の整数]の重複を引き起こすMIT E様因子をコードするDNA、又は

イヌし、かつゲノム遺伝子の挿入位置において(A) n G (A) n [nは1以上  
(b) (a) の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダ

(a) 配列番号1の塩基配列からなるDNA

E様因子:

【請求項3】可動性因子が、下記(a)又は(b)のDNAからなるMIT

因子。

【請求項2】可動性因子がMIT E様因子である請求項1記載の転写活性化

【請求項1】1以上の可動性因子を含むことを特徴とする転写活性化因子。

【特許請求の範囲】

【発明の名称】転写活性化因子

【書類名】明細書

のタソテム結合体である請求項2記載の転写活性化因子。

【請求項5】配列番号3記載の塩基配列を有するDNAからなる転写活性化

因子。

【請求項6】請求項1乃至5のいずれかに記載の転写活性化因子、並びに該

因子に作動可能に結合したDNA配列を含む、植物における導入遺伝子発現用カ

セット。

【請求項7】転写活性化因子に作動可能に結合したDNA配列がプロモータ

ー及び／又はターミネーターである請求項6記載の導入遺伝子発現用カセット。

【請求項8】転写活性化因子に作動可能に結合したDNA配列として、更に

発現させる所望の導入遺伝子配列を含む請求項7記載の導入遺伝子発現用カセッ

ト。

【請求項9】請求項1乃至5のいずれかに記載の転写活性化因子を含むプラ

ズミド。

【請求項10】請求項6乃至8のいずれかに記載の導入遺伝子発現用カセッ

トを含むプラスミド。

【請求項11】請求項6乃至8のいずれかに記載の導入遺伝子発現用カセッ

トを含むトランスジェニック植物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は転写活性化因子、より詳細には、該因子が遺伝子に挿入された場合に

、その挿入された周辺ないしは近傍に位置する遺伝子の転写を促進するか若しく

は該遺伝子の転写が不活性化されるのを抑制する性質を有する因子に関する。さ

らに本発明は、当該転写活性化因子を含むトランスジェニック植物に関する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子操作において、従来、高等生物への遺伝子の導入のほとんどは、原核生

物におけるプラスミドに相当するものがないため、核ゲノム挿入型の遺伝子導入

である。

【0003】

かかる核ゲノム挿入型の遺伝子導入には、挿入する所望の遺伝子を結合したベ

クターを、パータイクル・ガン法、リポフエキソシヨン法及びエレクトロポレーシ  
ヨソ法などによって高等生物の核ゲノムに導入する物理的方法と、前記ベクター  
をウイルス又は微生物に一旦導入して、そのウイルスもしくは微生物が有してい  
るDNA移送・挿入系を利用して高等生物の核ゲノムに導入する生物的方法とが

ある。

【0004】

しかし、これら物理的方法及び生物的方法はいずれも、高等生物に挿入された

遺伝子の発現活性が個体ごとにより一定しないという問題がある。この原因の  
多くは、位置効果 (position effect) によるサイレンシングである (Peach ら  
, Plant. Mol. Biol. 17 : 46-60 (1991))。かかる位置効果は酵母を始めとす

る多くの真核生物に見られる現象であり、挿入された遺伝子そのものの塩基配列  
は全く変わっていないにもかかわらず、その遺伝子が染色体上のどの位置に挿入  
されるかによってその発現活性が大きく変わってしまう、場合によってはその遺  
伝子の発現が不活性化 (サイレンシング) されてしまう現象である (細

胞の分子生物学, Molecular Biology of the Cell, 第3版, 434-435 (1995))

【0005】

かかるサイレンシング現象に基づいて、高等生物における核ゲノム中

の遺伝子はすべてが均一に転写されるわけではないこと、活発に転写されている  
遺伝子領域 (活性化領域 (active site)) と全く転写されていない遺伝子領域  
(不活性化領域 (cryptic site)) とが混在していることが報告されている。

不活性化領域に挿入された遺伝子は、転写に必要とされるタンパク質が全くアプ  
ローチできないためか、またはこの領域においてはゲノムDNAのメチル化が生  
じてヌクレオソーム構造が変化したり、ヘテロクロマチン化するために、全く転  
写が起らず、結果として遺伝子発現の不活性化 (サイレンシング) が  
生じていることが知られている (Ngら, Curr. Opin. Genet. Dev., 9:158-163(1999))

; Matzkeら, Curr. Opin., Plant Biol. 1:142-148(1999))。

【0006】

また、このジーン・サイレンシングは、X染色体に見られるように、同一生物

体の中でも細胞の分化状態によって異なることが知られている。さらに、現在の

ところ未解明の機構によってジーン・サイレンシングが生じると、それはその個

体でのみならず、交配によって生じた次世代の子孫にまで伝達されることが知ら

れている(細胞の分子生物学, Molecular Biology of the Cell, 第3版, 434-4

53 (1995))。

【0007】

ところで、遺伝子操作において、所望の遺伝子(外来遺伝子)を、ジーン・ノ

ックアウト法で用いられる相同組み換え法を除く、物理的方法もしくは生物的方法

のいずれかの方法で高等生物細胞に導入した場合、その遺伝子が細胞の核ゲノ

ムなどの領域に挿入されるかは細胞ごとに全く異なり、またそれを人為的に制御

することはほぼ不可能である。このため、外来遺伝子を高等生物細胞に導入する

と、外来遺伝子を核ゲノムの活性化領域に含む細胞と不活性化領域に含む細胞と

が不確定に形成されることになる。

【0008】

外来遺伝子が不活性化領域に挿入されると、その領域の不活性化場の影響を受

けるために、外来遺伝子の発現が著しく低下・消失してしまうことが知られてお

り、また活性化領域に外来遺伝子が挿入された場合であってもジーン・サイレン

シングによって外来遺伝子の発現が細胞分裂を繰り返して生長が進むにつれ不安

定化し、低下していくことが知られている(Peachら, Plant Mol. Biol. 17:

46-60 (1991))。

【0009】

外来遺伝子の発現が不活性化になる原因として主として考えられているのは、核

DNAの染色体内での構造である。その核DNAの構造に関与している因子とし

ては、MAR(matrix attachment region, SAR(scaffold attachment region

)とも呼ばれる)配列がある。これは核ゲノムDNAを核マトリクスにアソシエ

する配列として見出し出されたものである。動物において、MARを含むニトロリ



本発明は、位置効果によるジーン・サイレンシングという遺伝子不活性化現象

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

なっている。

「を開発することが、植物の遺伝子組み換えにおいて最も重要かつ早急な課題と性化する方法、具体的にはかかる性質のいずれかを有する所謂「転写活性化因子ジーン・サイレンシングを抑制するか、挿入された外来遺伝子自身の転写を活このため、ジーン・サイレンシングを回避する他の戦略として、位置効果によ

【0011】

広い土地が必要であるという土壌面積上の問題がある。

交配を重ねなくてはならないことから、多大なる労力と時間がかかるだけでなく、されている。このため、このような選抜には数多くの植物個体を育て且つ何代も返してもジーン・サイレンシングを起こらない植物個体を選抜することが必要と遺伝子が挿入された植物個体を選抜すること、さらに長年にわたって交配を繰り返植物個体の中からジーン・サイレンシングをなるべく引き起こさない位置に外来発においては、ジーン・サイレンシング現象を回避するために、非常に数多くの活性化をもたらすジーン・サイレンシング現象である。遺伝子組み換え植物の開し、そこで克服すべき最も重要な問題は、前述するように、外来遺伝子の発現不現在、遺伝子組み換え食品として遺伝子組み換え植物が開発されている。しか

【0010】

サイエンス 153-160 (1996)、秀潤社)。

では位置効果を打ち消すことができるとは考えられていない(飯、植物のゲノム調べる研究が行われているが、再現性のある結果は得られておらず、MA R単独いことが明らかになった。植物においても、形質転換体を用いてMA Rの効果はRは遺伝子の発現効率の上昇に寄与するが、それ単独では位置効果を打ち消さない94), Poljak ら, Nucleic Acids Res. 22:4386-4394 (1994)) によって、MA (1989)) が、その後の研究(Bonifer ら, Nucleic Acids Res. 22:4202-4210 (外来遺伝子の発現が上昇することが示された(Stiel ら, Nature 341 : 343-345のAエレクトを挿入したい外来遺伝子に結合して遺伝子導入した時、挿入した

を抑制する性質を有するか、またはその近傍若しくは周辺領域に位置する遺伝子の転写を活性化する性質を有する、所謂「転写活性化因子」を提供することを目的とするものである。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決すべく日夜鋭意研究を重ねていたところ、植物のゲノムDNAに導入した外来遺伝子の近傍若しくは周辺領域に可動性因子を挿入することによって、位置効果によるジーン・サイレンシング現象が有意に抑制されることを見出し、さらに、当該ジーン・サイレンシング抑制効果によるか若しくは上記可動性因子によって外来遺伝子の転写が活性化されることによって、該外来遺伝子の発現が増強されることを見出した。本発明者らは、かかる知見に基づいてさらに研究を重ねることにより、さらに上記可動性因子を植物の遺伝子組み換え用ベクターに組み込むことによって構築されたベクターが、位置効果によるジーン・サイレンシング現象を有意に抑制し得る、外来遺伝子の発現用カセットとして極めて有用なものであることを確信した。

【0014】

本発明は、これららの知見に基づいて完成されたものである。

【0015】

すなわち、本発明は下記項1～5に掲げる転写活性化因子である：

項1．1以上の可動性因子を含むことを特徴とする転写活性化因子。

項2．可動性因子がMITE様因子である項1記載の転写活性化因子。

項3．可動性因子が、下記(a)又は(b)のDNAからなるMITE様因子：

(a) 配列番号1の塩基配列からなるDNA

(b) (a)の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダ

イズし、かつ挿入位置において(A)nG(A)n [nは1以上の整数]の重複

を引き起こすMITE様因子をコードするDNA、及び／又は

下記(c)又は(d)のDNAからなるMITE様因子：

(c) 配列番号2の塩基配列からなるDNA

(d) (c)の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダ

イヌし、かつ挿入位置においてTAの重複を引き起こすMITF様因子をコードするDNA

である、項2記載の転写活性化因子。

項4. 可動性因子が、下記(a)又は(b)のDNAからなるMITF様因子：

(a) 配列番号1の塩基配列からなるDNA

(b) (a)の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダ

イヌし、かつ挿入位置において(A) n G (A) n [nは1以上の整数]の重複

を引き起こすMITF様因子をコードするDNA、及び

下記(c)又は(d)のDNAからなるMITF様因子：

(c) 配列番号2の塩基配列からなるDNA

(d) (c)の塩基配列からなるDNAとストリンジエントな条件でハイブリダ

イヌし、かつ挿入位置においてTAの重複を引き起こすMITF様因子をコード

するDNA

のタシテム結合体である項2記載の転写活性化因子。

項5. 配列番号3記載の塩基配列を有するDNAからなる転写活性化因子。

#### 【0016】

また、本発明は上記に掲げる転写活性化因子を含有する導入遺伝子発現用カセ

ットである。具体的には下記項6～8に掲げるカセットを挙げることができる：

項6. 項1乃至5のいずれかに記載の転写活性化因子、並びに該因子に作動可能

に結合したDNA配列を含む、植物における導入遺伝子発現用カセット。

項7. 転写活性化因子に作動可能に結合したDNA配列がプロモーター及び/又

はターミネーターである項6記載の導入遺伝子発現用カセット。

項8. 転写活性化因子に作動可能に結合したDNA配列として、更に発現させる

所望の導入遺伝子配列を含む項7記載の導入遺伝子発現用カセット。

#### 【0017】

さらに本発明は、上記に掲げられる転写活性化因子（例えば導入遺伝子発現用

カセットとして）を含むプラスミドであり、さらにはかかるプラスミドを利用し

て転写活性化因子が導入されたトランスジェニック植物に関するものである。

#### 【0018】

## 【発明の実施の形態】

本発明は転写活性化因子に関する。

【0 0 1 9】

なお、本発明でいう転写活性化因子とは、その因子の近傍乃至は周辺領域に位

置する遺伝子群の転写を促進する性質を有する因子、並びにゲノムDNAなどに導入した所望の外来遺伝子が位置効果によってジーン・サイレンシングされて不

活性化することを抑制する性質を有する因子を包括するものである。これまでに

知られている転写活性化をつかさどる因子は、エンハンサーとして特定の遺伝子

のプロモーターの近傍に存在し、当該プロモーターに直接シスに作用することに

よって転写を活性化するものである。これに対し、本発明の転写活性化因子は、

前述するように、プロモーターに対する位置に関係なく、近傍乃至は周辺領域に

位置する単一ないしは複数の遺伝子群の転写を促進するものである点で、さらに

内在する転写不活性化現象を抑制することによって実質上転写を促進するものを

包含する点で、従来の転写活性化因子の概念よりもより広い概念を意味するもの

である。

【0 0 2 0】

本発明の転写活性化因子は、1以上の可動性因子を含むことを特徴とするもの

である。

【0 0 2 1】

ここで可動性因子は、大きくDNA型（トランスポゾンおよび挿入配列）、R

NA型（レトロトランスポゾン）（Bergら編集、Mobile DNA（1989））、並びに

これらのいずれにも属さないもの、すなわちminiature-inverted repeat transp

osable element（MITE）（Wesslerら、Curr. Opin. Genet. Dev. 5：914-8

21（1995）の3種類に大別される。

【0 0 2 2】

本発明の転写活性化因子には、可動性因子としてこれらの少なくとも1種を、

同一種若しくは異種の別を問うことなく、1以上含有するものがいずれも包含さ

れる。好ましくは可動性因子としてMITEを含有するものである。

【0 0 2 3】

MITEは、Bureauらによって1992年に初めてTourist属として見いだされた可動性因子であり (Bureauら, Plant Cell 4: 1283-1294 (1992))、それ以来、植物、昆虫並びに動物のゲノムからも各種のMITEが見いだされている。一般にMITEは、(1) その5'末端領域及び3'末端領域の両領域に完全もしくは不完全な逆反復配列を有する (この点でDNA型可動性因子と類似する。)、(2) その逆反復配列の両末端側に、DNA型可動性因子がゲノムDNAに挿入される際に生じるのと同様に、2塩基対以上の同方向反復配列を有する標的重複配列様の配列が見いだされる、及び(3) 大きさが一般的に2kb以下である、といった特徴を有するものとして定義される (Wesslerら, Curr. Opin. Genet. Dev. 5: 914-821 (1995))。

## 【0024】

本発明においては、可動性因子として、かかる定義の範疇に属するいずれのMITEを用いることができる。

## 【0025】

中でも好適なMITEとしては、ゲノム遺伝子の挿入位置に (A) n G (A) n の重複をもたすことを特徴とする可動性因子を挙げることができる (以下、かかるMITEを便宜上「IS2因子」とも称する。)

## 【0026】

ここでnは1以上の整数であればよく、特に制限されないが、具体的には2～6、好ましくは3～5、より好ましくは4を挙げることができる。かかるIS2因子は、より具体的には、大きさが2kb程度以下、好ましくは0.2～2kb程度のDNAであり、その5'末端領域及び3'末端領域に互いに逆向きの反復配列 (末端逆反復配列) を有するものである。

## 【0027】

またIS2因子は、他の構造的な特徴として、その塩基配列中に式 (1) :  
X t t g c a a Y (式中、Xはg又はtを、Yはa又はcを示す) (配列番号4～7)、または式 (2) :

Z a t g c a a (式中、Zはt又はaを示す) (配列番号8～9)

で示される塩基配列の少なくとも1つを、連続又は非連続に反復して含有するも

のである。かかる反復配列の位置及びその数は特に制限はなく、IS2因子の両末端領域に位置する末端逆反復配列中、または両方（5'末端領域、3'末端領域）の末端逆反復配列間に挟まれた中間領域中に含まれていても良い。

【0028】

かかるIS2因子として具体的には、図1に示すように、上記式（1）及び式（2）で示される反復配列を複数、末端逆反復配列間の中間領域中に含み、また式（1）で示される反復配列を複数、末端逆反復配列中に含む構造を有するものを挙げることができる。

【0029】

またIS2因子が有する末端逆反復配列は、両者が互いに厳格に相補的な配列である必要はなく、5'末端領域と3'末端領域とがストリントな条件で互いにハイブリダイズし、その結果、IS2因子が図1に示すようにシステム構造となるものであれば足りる。この意味でIS2因子は、末端逆反復配列として完全のみならず不完全な逆反復配列を有するものを包含するものである。

【0030】

本発明で用いられる具体的なIS2因子としては、末端逆反復配列として、5'末端領域に配列番号10の塩基配列を有し、また3'末端領域に配列番号11の塩基配列を有するものを例示することができる。IS2因子としてより具体的には、配列番号1で示す塩基配列を有するものである。なお、IS2因子は、それ自身の機能または活性を実質的に有する機能的同等物であるかぎり、5'または3'末端逆反復配列もしくはこれらの反復配列に挟まれた中間領域に位置する配列において、1つまたは複数のヌクレオチドが置換、付加または欠失していてもよく、本発明で用いられるMITE様因子はかかるMITEの機能的同等物を包含するものである。

【0031】

好ましい機能的同等物としては、配列番号1の塩基配列を有するMITE（IS2因子）の機能または活性（少なくとも本発明でいう転写活性化作用）を実質的に有し、ゲノム遺伝子への挿入位置において（A）nG（A）n[nは1以上の整数]の重複を引き起こし、かつ上記IS2因子（配列番号1）とストリント

エントな条件でハイブリダイズするものを挙げる。尚、ストリレンジントな条件としては、 $1 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{w/w}$  SDS中、 $50^\circ\text{C}$ 以上で1時間の条件を挙げる。より具体的には、機能的同等物として、上記1 S2因子の機能、特に本発明の転写活性化作用を有するとともに、配列番号1で示される1 S2因子と比べた場合に、塩基配列において70%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、更に好ましくは95%以上のホモロジ一を有するものを挙げる。ことができる。

#### 【0032】

また、他の好適なMITEとしては、ザノム遺伝子への挿入位置にTAの重複をもたらし、かつ末端逆反復配列として5'末端領域に配列番号12の塩基配列を、また3'末端領域に配列番号13の塩基配列を有することを特徴とする可動性因子を挙げる。ことができる(以下、かかるMITEを「1 S1因子」ともいう。)。かかる1 S1因子としては、具体的には大きさが1 kb程度以下、好ましくは100 bp～500 bp程度のDNAを挙げる。ことができる。

#### 【0033】

1 S1因子として具体的には、図2に示す構造を有するものを例示することができる。より具体的には配列番号2で示される塩基配列を有するものが例示できる。なお、1 S1因子は、それ自身の機能または活性を実質的に有する機能的同等物であるかぎり、5'または3'末端逆反復配列もしくはこれらの反復配列に挟まれた中間領域に位置する配列において、1つまたは複数のヌクレオチドが置換、付加または欠失していてもよく、本発明で用いるMITE様因子はかかる機能的同等物を包含するものである。

#### 【0034】

好ましい機能的同等物としては、配列番号2の塩基配列を有する1 S1因子の機能または活性(少なくとも本発明でいう転写活性化作用)を実質的に有し、挿入位置においてTAの重複を引き起こし、かつ上記1 S1因子(配列番号2)とストリレンジントな条件でハイブリダイズするものを挙げる。ことができる。尚、ストリレンジントな条件としては、前述するように、 $1 \times \text{SSC}$ 、 $0.1\% \text{w/w}$  SDS中、 $50^\circ\text{C}$ 以上で1時間の条件を挙げる。より具体的には、

機能的同等物として、上記 I S 1 因子の機能、特に本発明の転写活性化作用を有するともに、配列番号 2 で示される I S 1 因子と比べた場合に、塩基配列において 7 0 % 以上、好ましくは 8 5 % 以上、より好ましくは 9 0 % 以上、さらに好ましくは 9 5 % 以上のホモロジーを有するものを挙げることができる。

【 0 0 3 5 】

これらの I S 2 因子及び I S 1 因子は、後述するようにニンジンのゲノム、具体的にはニンジンのフェニルアラニンプロモーター遺伝子から本発明者によって新たに見出されたものであり、本明細書の実施例の記載に従って単離・取得することができる。

【 0 0 3 6 】

本発明の転写活性化因子は、好適には、前述する I S 2 因子、I S 1 因子及びそれらの機能的同等物の少なくとも 1 つの塩基配列を含むものである。

【 0 0 3 7 】

より具体的には、本発明の転写活性化因子としては、① I S 1 因子又はその機能的同等物の塩基配列を有するもの、② I S 2 因子又はその機能的同等物の塩基配列を有するもの、③ I S 1 因子若しくはその機能的同等物の塩基配列と I S 2 因子若しくはその機能的同等物の塩基配列をタヌテムに結合してなる塩基配列を有するもの ( I S 1 因子と I S 2 因子の順は不同 ) 、④ I S 1 因子 ( 若しくは I S 2 因子 ) 又はその機能的同等物の塩基配列を任意の塩基配列を介して、I S 2 因子 ( 若しくは I S 1 因子 ) 又はその機能的同等物の塩基配列と結合してなる塩基配列を有するもの、などを例示することができる。転写活性化因子として、好ましくは I S 2 因子若しくはその機能的同等物、I S 1 因子 ( 若しくは I S 2 因子 ) 若しくはその機能的同等物と I S 2 因子 ( 若しくは I S 1 因子 ) 若しくはその機能的同等物とのタヌテム結合体を挙げることで、後者のものとして具体的には配列番号 3 に記載する塩基配列を有するものを挙げるができる。

なお、上記④に掲げる転写活性化因子において、I S 1 因子と I S 2 因子 ( 順不同 ) との間に位置する塩基配列は、本発明の効果を妨げない限り特に制限されず、任意の塩基配列を用いることができる。具体的には、制限はされないが、一例としてニジン P A L プロモーター配列に由来するものを挙げるができる。



また、かかる塩基配列は、通常 5～1000bp、好ましくは 300～500bp の塩基長を有することができる。かかる態様の転写活性化因子としては、具体的には配列番号 14 に掲げる塩基配列を有するものを例示することができる。

### 【0038】

本発明の転写活性化因子は、植物体に導入する所望の遺伝子配列（導入遺伝子配列（外来遺伝子配列を含む））に作動可能に結合することができる、さらに該導入遺伝子配列を結合した転写活性化因子は、植物機能性プロモーターや植物機能性ターミネーター等の機能性 DNA 配列に作動可能に結合することができる。

### 【0039】

なお、本発明において「作動可能に結合する」とは、転写活性化因子が、上記導入遺伝子配列または各種の機能性 DNA 配列に対して、挿入位置及び方向に係わらず、これらの配列に影響を及ぼし得るに十分な程度に該配列の近傍に位置することを意味する。

### 【0040】

本発明において、導入遺伝子としては植物中での発現が所望される DNA を、該植物に対して同種若しくは異種の如何を問わず、挙げることができる。かかる導入遺伝子には、例えば  $\beta$ -グルクロニダーゼをコードする遺伝子；抗生物質耐性遺伝子；殺虫及び殺菌タンパク質毒素をコードする遺伝子；耐病原菌化合物；過敏応答化合物、例えばペルオキシダーゼ、グルカナーゼ、及びキチナーゼ、並びにナイトロレキシンを合成する遺伝子；農薬、除草剤及び殺菌剤耐性遺伝子；植物酵素（例えばタンパク質、ヌターチ、糖及び脂肪の含量又はその質に関連した酵素）を合成する遺伝子及びそれらの調節因子遺伝子；植物酵素阻害剤、例えばフロラフェーゼ及びアミラーゼ阻害剤に関する遺伝子；植物ホルモン合成に係わる遺伝子；昆虫ホルモン及びフエロモンの合成に係わる遺伝子；医薬及び栄養化合物、例えば  $\beta$ -カロチンやビタミン合成に係わる遺伝子；並びに植物中に存在するヌクレオチド配列に干渉するアプタゼンヌ転写物質が含まれるが、それらに何ら限定されるものではない（TRANSGENIC PLANT, 第 1 巻、Academic Press 1993）。

### 【0041】

また本発明は、前述する転写活性化因子、並びにそれに作動可能に結合してなるDNA配列を含む、植物への適用に適した遺伝子発現用カセットに関する。なお、本発明で遺伝子発現用カセットとは、植物に導入するために用いられるプラズミド並びにそのサブクレンジメントを意味する。

#### 【0042】

ここで転写活性化因子に作動可能に結合してなるDNA配列としては、プロモーター又はターミネーター等の機能性DNA配列を挙げることができ、さらに前述する導入遺伝子配列を含めることができる。

#### 【0043】

ここでプロモーターとは、該プロモーターの下流に目的とするタンパク質の構造遺伝子を連結した場合、該タンパク質の植物細胞内における発現を制御する能力を有するDNA配列を包含するものであり、植物の形質転換のために当業界で用いられているあらゆる植物機能性プロモーターが含まれる。従来から植物の形質転換用に多数のプロモーターが用いられており、これらには例えばアグロバクテリウム・ツメツフシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) から単離されるプロモーターである、オクトピレンシタゼ (ocs) プロモーター (L.Comai et al., 1985; C.Waldron et al., 1985)、マノピレンシタゼ (mas) プロモーター、及びノバリンシタゼ (nos) プロモーターが含まれる。また、カリフラワ

ーモザイクウイルス (Cauliflower Mosaic Virus) 35Sプロモーターは、双子葉類の形質転換に汎用されているプロモーターであり、本発明においても好適に使用できる。また35Sプロモーターの改変物、例えば2つの並列35Sプロモーター (R.Kay et al., 1987) およびmas-35Sプロモーター (L.Comai et al., 1990) などを用いることができる。さらに、カリフラワーモザイクウイルス19Sプロモーター (J.Paszowski et al., 1984;) やコブノハグサモザイクウイルス由来の34Sプロモーター (M.Sanger et al., 1990) をも含めることができる。また、植物由来のプロモーターであるアクチン・プロモーター、リプロース-1,5-二リン酸カルボキシラゼ小サブユニット (rbcs) プロモーター等も

例示できる。

#### 【0044】

またターミネーターとは、植物細胞内で目的の構造遺伝子を効率よく転写終結させる能力を有するDNA配列を包含するものであり、植物の形質転換のために当業界で用いられているあらゆる植物機能性ターミネーターが含まれる。具体的には、例えばノバリンシンターゼ (nos) ターミネーターを代表的なものとして挙げる事ができる。

## 【0045】

本発明の転写活性化因子、または該因子を含む本発明の導入遺伝子発現用カセットは、広く植物一般に対して、導入された遺伝子の該植物内での発現誘導もしくは発現調節に用いることができる。

## 【0046】

植物としては、特に制限はされないが、特に農業上有用な植物を、単子葉植物と双子葉植物の別なく、挙げる事ができる。例えば単子葉類には、トウモロコシ、イネ、小麦、大麦、モロコシ、カラス麦、ライ麦、キビ等の穀物類作物、ユリ、ラン、アヤメ、ヤシ、チューリップ、スズランなどの各種観葉植物が含まれる。また双子葉類には、キク、キンギョソウ、カーネーション、モクレン、ケシ、キヤベツ、バラ、エンドウ、ポインセチア、ワタ、サボテン、ニンジン、コケモロ、ハツカ、ヒマワリ、トマト、ニレ、オーク、カエデ、ボナ、ダイズ、メロン、リンサイ、ナタネ、ジャガイモ、レタスなどが含まれる。

## 【0047】

さらに本発明は、本発明の転写活性化因子、または該因子を含む本発明の導入遺伝子発現用カセットを含むことによって、導入された所望の外来遺伝子の位置効果によるジーン・サイレンシング現象（不活性化現象）が抑制されるか、若しくは外来遺伝子の転写が活性化されてなるトランスジェニック植物を提供するものである。なお、当該トランスジェニック植物には、これら植物の子孫も含まれる。

## 【0048】

なお、ここで「植物」とは、完全な植物体のみならず、例えば葉、種子、球根、さし穂などの植物体の一部を包含する趣旨で用いられ、さらにはプロトプラス

ト、植物カルス及びメリクロン増殖体などの植物細胞をも包含するものである。

【0049】

かかるトランスジェニック植物を作成する方法は、特に制限されず、業界で慣用されている任意のDNA導入方法を使用することができる。具体的には、本発明の転写活性化因子、または該因子を含む導入遺伝子発現用カセットを含む発現プラスミドを用いて植物細胞にDNAを導入する方法であり、例えば、プロポバクテリウム法、電氣的導入法（エレクトロポレーション）、パーチクルガン法などの公知の方法を挙げることができる。

【0050】

かくして得られる本発明の転写活性化因子、該因子を含む導入遺伝子発現用カセット、または発現プラスミドを含む有する植物細胞は、例えば、S.B.Gelvin, R.A. Schilperoort and D.P.S. Verma 著: Plant Molecular Biology Manual (1991)、Kluwer Academic Publishers や Valvekens et al. Proc Natl. Acad. Sci., 85: 5536-5540 (1988) に記載される植物組織培養技術で用いられる通常の方法に従って再生することにより、該植物細胞に由来する植物体またはその一部を得ることができる。

【0051】

なお、本発明の発現プラスミドは、植物細胞に導入する所望のDNA配列（導入遺伝子）とともに転写活性化因子並びにプロモーターやターミネーター等の機能性DNA配列を含むものであればよいが、これらのDNA配列が互いに作動可能に結合されていることが好ましい。なお、ここで作動可能に結合しているとは、プラスミドが意図された目的のために作用することを意味する。具体的には、当該プラスミドが植物細胞内に導入された場合に、該プラスミドに含まれるプロモーターが不活性化されることなく、転写活性化因子の制御のもとで所望の導入遺伝子（構造遺伝子）が発現され、またその発現がターミネーターの働きによって効率よく転写終結されることを包含する。

【0052】

また本発明は、植物中で導入遺伝子が発現させる方法を含む。かかる方法は、少なくとも、前述するような導入遺伝子を組み込んだ導入遺伝子発現用カセットを植物に導入する工程、及び該植物において前記導入遺伝子が発現させる工



程によって行うことができる。なお、植物への導入遺伝子発現用カセット (DN A) の導入並びに導入遺伝子の発現は、いずれも当業界における公知方法を用いて行うことができる (Plant Molecular Biology Manual 1991, Kluwer Academic Publishers)。

【 0 0 5 3 】

【実施例】

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。ただし、本発明はかかる実施例によって何ら限定されるものではない。なお、本発明で用いられる遺伝子工学的技術並びに分子生物学の実験操作 (制限酵素処理条件、ライゲーション反応条件、大腸菌へのトランスフォーマーシヨン方法等) は、一般に広く用いられている方法、例えば J. Sambrook, E., F., Frisch, T., Maniatis 著、モレキュラークローニング第 2 版 (Molecular Cloning 2nd edition)、コールド・スプリング・ハーバーラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory press) 発行、1989 年、及び D. M., Glover 著、DNA クローニング、IRL 発行、1985 年などに記載されている方法に従って行うことができる。

【 0 0 5 4 】

実施例 1

1) 標的植物、標的遺伝子

M I T E 様因子の探索にあたり、標的植物としてニンジン (*Daucus carota* L. cv. Kurodagosun) を用い、標的遺伝子として当該ニンジンのフェニルアラニンアミリアーゼ (Phenylalanine ammonia-lyase: P A L) 遺伝子を用いた。

【 0 0 5 5 】

2) ニンジン P A L 遺伝子 g D C P A L 3 および g D C P A L 4 のクローニング  
ニンジン核 DNA ライブラリーから、ニンジン核遺伝子をクローニングした。

なお、ニンジン核 DNA ライブラリーは、本発明者による先行文献 (Ozeki, Y., Davies, E. and Takeda, J.; Structure and expression of chalcone synthase gene in carrot suspension cultured cells regulated by 2,4-D. Plant Cell Physiol., 34 : 1029-1037 (1993)) の記載に従って、ニンジン培養細胞 (Ozeki, Y. and Komamine, A.; Induction of anthocyanin synthesis in relation

to embryogenesis in a carrot suspension culture ; Correlation of metabolic differentiation with morphological differentiation. *Physiol. Plantarum*, 53 : 570-577 (1981)) から EMBL3 ベクター (東洋紡績 (株) 製) を用いて作成した。

## 【0056】

具体的には、ニンジン核DNAを、Murray and Thompson(1980)の方法 (Murray, M.G. and Thompson, W.F. ; Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.* 8 : 4321-4325 (1980)) に従って、臭化セチルトリメチルアモニウム (CTAB) 溶液を用いて凍結乾燥したニンジンから調製した。得られた核DNAを Sau3AI で部分消化し、シヨ糖濃度勾配法によってサイズ分画した。15~20kbpの範囲にあるDNA画分を集めて、BamHI消化した EMBL3 ベクターにライゲーションして、フリーズ粒子内にパッケージングすることによってニンジン核ライゲーションを構築した。

## 【0057】

次いで、ニンジン核ライゲーションからニンジンPALゲノムクローンを、Ozekiら(1990)の文献 (Ozeki, Y., Matsui, K., Sakuta, M., Matsuoka, M., Ohashi, Y., Kano-Murakami, Y., Yamamoto, N. and Tanaka, Y. ; Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during anthocyanin synthesis and by transfer effect in carrot cell suspension cultures. *Physiol. Plantarum*, 80 : 379-387 (1990)) に記載の方法でクローニングされた PAL cDNA (ANT-PAL cDNA) をプローブとして用いて、スクリーニングした (Sambrook et al. 1989)。なお、ニンジン核ライゲーションのスクリーニングのハイブリダイゼーションは、6×SSC, 60mM リン酸ナトリウム (pH6.8), 10mM EDTA, 1% SDS, 0.02% ボリビニルピロリドン, 0.02% Ficoll 400, 及び100  $\mu$ g/ml 変性サケ精子DNAを含む溶液で68℃で終夜処理することにより行った。また、メンブラの洗浄は、2×SSC, 0.5% SDSの溶液中で室温15分で2回、0.1×SSC若しくは1×SSC, 0.1% SDSの溶液中で室温10分で2回、最後に0.1×SSC溶液中で68℃で30分を2回行うことによって実施した。

## 【0058】

その結果、8個のポジティブ・クローンが得られた。かかるクローンについて制限酵素マッピングを作成したところ、それらは2種類に分類され、それらをおの

の gDCPAL3 および gDCPAL4 と命名した。

### 【0059】

gDCPAL3 について、Sambrook et al. (1989) に記載された方法でポジティブ・クローンのライブラリーを培養し、λ DNA を抽出して Bam HI で切断し、ナイロン膜にサザン・トランスファーを行った。これを、前記 ANT-PAL cDNA を EcoRI で切断した DNA 断片 (984 bp) の 5' 端を [<sup>32</sup>P] で標識したものをプローブとして、サザン解析を行い、該プローブがハイブリダイズする 2.77 kbp の DNA 断片を得た。この DNA 断片を、Bam HI で切断し calf intestine alkaline phosphatase (CIP) 処理した pBluescript SK プラスミドにサブ・クローニングして gDCPAL3-pro/SK を得た (図 3 参照)。次いで得られたプラスミド gDCPAL3-pro/SK を、制限酵素 Sal I と Apa I で切断し、Sambrook et al. (1989) に記載された方法で Exonuclease III および Mung bean nuclease を用いて、一連の欠失 DNA 断片群を作成し、これらを用いて gDCPAL3 の DNA の塩基配列を決定した。Ozeki and Takeda (1994) の文献 (J. Regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes in carrot suspension cultured cells. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 38 : 221-225 (1994)) に記載される、ニンジンから抽出した mRNA を用いたライマー・エクストラクション法によって見いだされたバンド

の位置から転写開始点 (+1) を決定した。

### 【0060】

gDCPAL4 についても同様にして、上記に対応するプラスミド gDCPAL4-pro/SK を作成して、gDCPAL4 の DNA の塩基配列並びにその転写開始点を決定した。具体的には、ポジティブ・クローニング gDCPAL4 のライブラリーから得た λ DNA を Hind I と Bam HI で切断し、同上のプローブを用いてサザン解析を行い、プローブがハイブリダイズする 1.63 kbp の DNA 断片を Hind III と Bam HI で切断し、CIP 処理した pBluescript SK プラスミドにサブ・クローニングして gDCPAL4-pro/SK を得た。次いで得られたプラスミド gDCPAL4-pro/SK を、制限酵素 Xba I と Bst XI で切断し、Sambrook et al. (1989) に記載された方法で Exonuclease III

および Mung bean nuclease を用いて、一連の欠失 DNA 断片群を作成し、これらを用いて gDCPAL4 の DNA の塩基配列を決定した。

【0061】

## 3) 結果

決定した gDCPAL3 および gDCPAL4 の塩基配列を比較したところ、gDCPAL3 プロモーター領域には gDCPAL4 には見られない不完全な逆向き繰り返し配列を持つた miniature inverted-repeat transposable element (MITE) が、-1897 ~ -1599 (長さ 299 bp) および -1157 ~ -389 (長さ 769 bp) の2箇所に存在することがわかった(図4)。これらの配列をそれぞれ IS1 および IS2 と命名した。

【0062】

これらの配列並びに挿入位置周辺の塩基配列について、それぞれオートシーケンサー (ABI社製) でシーケンスを行った。IS1 の塩基配列を配列番号2に、IS2 の塩基配列を配列番号1にそれぞれ示す。

【0063】

これらの IS1 及び IS2 の性状は下記の通りであった。

① IS1

配列番号2に示す塩基配列 (全長 299 bp) からなり、5' 末端領域及び 3'

末端領域にはそれぞれ互いに不完全な逆反復配列 (32 bp) を有し、また標的遺伝子であるザノムへの挿入位置には TA の標的重复配列が見られた。このことからすでに報告されている Stowaway 属 (Bureau, T. E. and Wessler, S. R. Stowaway: a new family of inverted repeat elements associated with the genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants.; Plant Cell, 6: 907-16 (1994)) に属する新規な MITE 因子の遺伝子配列であることが推定された。IS1 因子のヌクレオチド構造、並びに末端逆反復配列領域及び挿入位置領域の構造を、図2に示す。

【0064】

また得られた塩基配列の情報をもとに、市販のナータベース (例えば GENE TYX -MAC/CD1995) を用いて塩基配列及び プリミノ酸配列のホモロジー解析を行ったと



実施例1において塩基配列の決定のために作成した gDCPAL3 プロモーター領域の 3' 端からの欠失 DNA 断片を有するプラスミドの中から、-1581 まで欠失したプラスミド (gDCPAL3-IS1/SK) を選び、これを KpnI で切断し、T4 DNA pol ymerase を用いて末端平滑化した後、Sca I で切断し、7 ガロース・ガル電気泳動によって 321 bp の DNA 断片を切り出した。これを、Hinc II で切断し CI P 処理した pBluescript SK プラスミドにサフ・クローニングした。このサフ・クローニングによって得られた複数の独立クローニングの大腸菌コロニーからプラスミドを抽出し、その塩基配列を決定することによって、DNA 断片の挿入方向を調べ、pBluescript SK プラスミドのアルチ・クローニング部位の Kpn I 側に IS1 の 5' 端側が挿入されているものを選び、これを IS1/SK とした。また pBI221 (Clontech Inc.) を Hind III および Sma I で切断して得られたカリフラワー

(1) IS1, IS2, IS12 および MU3 のクローニング

(i) IS1 のクローニング (図7)

## 実施例2

【0066】

に示す。

を図1に、その末端逆反復配列領域及び挿入位置領域の構造 (塩基配列) を図6にMITE様因子であることが判明した。IS2 因子の全体構造 (スナム構造) の可動性因子ファミリーに属さない新規なファミリーを構成する可動性因子、特

ジー比較を行ったが、既知可動性因子との相同性が見られず、このことから従来

の挿入位置にAAGAAAGAAの標的重複配列が見られた。塩基配列のホモロ

領域に不完全な逆反復配列 (158bp) を有し、また標的遺伝子であるゾムハ

配列番号1の塩基配列 (全長769bp) からなり、5' 末端領域及び3' 末端

②IS2

【0065】

あることが確認された (図5)。

ホモロジーがあり、このことから当該因子がStowaway 属に属する可動性因子で

するMITE因子の遺伝子配列と末端逆反復配列において70~90%の割合で

ころ、すでに報告されている Stowaway 属 (Bureau and Wessler (1994)) に属

モザイクウイルス 35S プロモーター (35S) 断片をアガロース・ゲル電気泳動によって切り出し、Hind III および Sma I で切断し CIP 処理した pBluescript SK プラスミドにサフ・クローニングし、これを 35S/SK とした。IS1/SK を Kpn I と Hind III で切断し、アガロース・ゲル電気泳動によってインサート DNA 断片を切り出し、これを Kpn I と Hind III で切断し CIP 処理した 35S/SK プラスミドにサフ・クローニングし、35S プロモーター領域の上流域に IS1 領域を有する IS1-35S/SK を得た。

【0067】

(ii) IS2 のクローニング (図 8)

実施例 1 において塩基配列の決定のために作成した gDCPAL3 プロモーター領域の 3' 端からの欠失 DNA 断片を有するプラスミドから、-389 まで欠失した

プラスミド (gDCPAL3-IS12/SK) を選び、これを、KpnI で切断し、T4 DNA polymerase を用いて末端平滑化した後、Dde I で切断し、アガロース・ゲル電気泳

動によって 797 bp の DNA 断片を切り出し、これを、Hinc II で切断し CIP 処理した pBluescript SK プラスミドにサフ・クローニングした。このサフ・クロ

ーニングによって得られた複数の独立クローソンの大腸菌コロニーからプラスミドを抽出し、その塩基配列を決定することによって、DNA 断片の挿入方向を調べ、

pBluescript SK プラスミドのアルチ・クローニング部位の Kpn I 側に IS2 の 5' 端側が挿入されているものを選び、これを IS2/SK-1 とし、またその反対方向

、すなわち KpnI 側に IS2 の 3' 端側が挿入されているものを IS2/SK-2 (reverse) とした。

【0068】

IS2/SK-1 を Kpn I と Hind III で切断し、アガロース・ゲル電気泳動によってインサート DNA 断片を切り出し、これを、Kpn I と Hind III で切断し CIP 処理した 35S/SK プラスミドにサフ・クローニングし、35S プロモーター領域の上流域に IS2 領域 (正鎖) を有する IS2-35S/SK を得た。

【0069】

(iii) IS12 (IS1 と IS2 のタフテム結合体) のクローニング (図 9)

(ii) で得られた IS2/SK-2 (reverse) を KpnI で切断し、T4 DNA polymerase

を用いて末端平滑化した後、Hind III で切断し、 $\Phi$ ガロース・ゲル電気泳動によってインサート DNA 断片を切り出した。これを、Pst I で切断して T4 DNA polymerase による末端平滑化後、Hind III で切断し CIP 処理した IS1-35S/SK プラスミドにサフ・クローニンゲルし、35S  $\Phi$ ロモーター領域の上流域に IS1 領域と IS2 領域とをタフテムに有する IS12-35S/SK を得た。

【0070】

(iv) MU3 のクローニンゲ (図 10)

MU3 は gDCPAL3-IS12/SK を KpnI で切断し、T4 DNA polymerase を用いて末端平滑化した後、Sca I で切断し、 $\Phi$ ガロース・ゲル電気泳動によって 1,514 bp の DNA 断片を切り出した。これを、Hinc II で切断し CIP 処理した pBluescript SK プラスミドにサフ・クローニンゲした。このサフ・クローニンゲによって得られた複数の独立クローニンの大腸菌コロニーからプラスミドを抽出し、その塩基配列を決定することによって、DNA 断片の挿入方向を調べ、pBluescript SK プラスミドのアルチ・クローニンゲ部位の Kpn I 側に IS1 の 5' 端側が挿入されているものを選び、これを MU3/SK とした。MU3/SK を Kpn I と Hind III で切断し、 $\Phi$ ガロース・ゲル電気泳動によってインサート DNA 断片を切り出した。これを、Kpn I と Hind III で切断し CIP 処理した 35S/SK プラスミドにサフ・クローニンゲし、35S  $\Phi$ ロモーター領域の上流域に IS1 領域と IS2 領域とを、gDCPAL3 に由来する領域の配列 (441 bp) を介して、有する MU3-35S/SK を得た。

(2) IS1, IS2, IS12 および MU3 の植物遺伝子発現ベクターへの組み込み (図 11)

PABN-Hml (Mita, S., Suzuki-Fujii, K. and Nakamura, K. Sugar-inducible expression of a gene for  $\beta$ -amylase in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol., 107: 895-904 (1995)、名古屋大学・中村研三先生より分与) を Hind III で切断し、 $\beta$ -amylase  $\Phi$ ロモーター (1.7 kb) を切り出し、T4 DNA polymerase を用いて末端平滑化した後、Xba I で切断し、CIP 処理した後、Ti-プラズミド領域、並びにカナマイシン耐性遺伝子 [nos- $\Phi$ ロモーター・ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ II 遺伝子のコード領域 (nptII)・nos ターミネー

ター]、 $\beta$ -グルクロニダーゼ遺伝子のコード領域 (GUS)・nos ターミナーター及びハイグロマイシン耐性遺伝子 [35S プロモーター・ハイグロマイシンホスフオトランスフェラーゼ遺伝子のコード領域 (HPT)・nos ターミナーター]を含む 10 kbp の DNA 断片をアガロース電気泳動によって分離した。これに、35S/SK を Hind III で切断し、T4 DNA polymerase を用いて末端平滑化した後、Xba I で切断して得られた 35S 断片をサブ・クローニングし、pAB35S を作成した。

## 【0071】

この pAB35S を Xho I および Xba I で切断して、CIP 処理した後、アガロース電気泳動によって 35S DNA 断片を切り除いてベクターを調製した。一方、前

述により調製された IS1-35S/SK、IS2-35S/SK、IS12-35S/SK、及び pMU3-35S/SK の各々を Xho I および Xba I で切断してアガロース電気泳動によってインサ

ート用の DNA 断片 (導入遺伝子発現用カセット) を切り出した。かかる DNA 断片を上記のベクターにライゲーションし、大腸菌 DH5 $\alpha$  にトランスフォーム

シヨシした。得られた大腸菌をカナマイシン 25  $\mu$ g/L を含む LB 寒天培地 (1% バクトトリプトン、0.5% イーストエキストラクト、1% 塩化ナトリウム、1.5%

細菌培地用寒天末) にまき、得られたコロニーからアラスミドを迅速アラスミド DNA 抽出法により抽出し、得られたアラスミドの制限酵素マップを調べるこ

とによって、図 1 に示すように、pIS1-35S/AB35S、pIS2-35S/AB35S、pIS12-35S/AB35S および pMU3-35S/AB35S の各コンストラクト、すなわちカナマイシン耐性を

示す nptII 遺伝子と構造遺伝子である GUS 遺伝子との間に上記の各導入遺伝子発現用カセットがそれぞれ組み込まれてなるコンストラクトが作成されていることが

確認された。

## 【0072】

(3) *Agrobacterium tumefaciens* のコンピラントセル作製

*A. tumefaciens* EHA 101 のグリセロールストックから白金耳で菌体を取り、

YEP 固体培地 (イーストエキストラクト 1%, バクトペプトン 1%, 塩化ナトリウム 0.5% の YEP 培地に 1.5% になるように細菌培地用寒天末を加えてオートク

レーブして固化させたもの。以下同じ) に塗布し、28℃ で 2 日間、暗黒下

で培養した。増殖した *A. tumefaciens* の単コロニーを爪楊枝でかきとり、1.5 ml の YEP 培地に植菌し 28℃ で一晩振とう培養した。500 ml フラスコに 80 ml YEP 培地を入れ、増殖した *A. tumefaciens* の菌液を 0.8 ml 加え、28℃ で  $OD_{600} = 0.4$  まで振とう培養した。これを氷冷したあと、あらかじめ氷冷しておいた遠心管に移し、6,000 rpm で 5 分間、4℃ のもとで遠心し、上澄みを除いて 10% グリセロールを 20 ml 加え懸濁した。この操作を 3 回繰り返し、培地を完全に除いて *A. tumefaciens* のコンピメントセルを取得した。ストック用に、400  $\mu$ l の 10% グリセロールに懸濁後、チューブに 40  $\mu$ l ずつ分注し、液体窒素中で急速凍結した。

## 【0073】

(4) フラスミド DNA の *A. tumefaciens* への導入

(2) で得られた各種コンストラクト (フラスミド pIS1-35S/AB35S, pIS2-35S/AB35S, pIS12-35S/AB35S および pMU3-35S/AB35S) を、エレクトロポレーション (島津製作所製 GTE - 10 使用) により *A. tumefaciens* コンピメントセルに導入した。

## 【0074】

具体的には、(3) で調製したコンピメントセル 40  $\mu$ l に、(2) で作成したフラスミド pIS1-35S/AB35S (IS1), pIS2-35S/AB35S (IS2), pIS12-35S/AB35S (IS12) および pMU3-35S/AB35S (MU3)、並びに比較対照のために、転写活性化因子 (IS1 および/または IS2) を組み込んでいないプラスミド pAB35S (35S) を、それぞれ約 100 ng ずつ混合して、エレクトロポレーション用セルに移した。電気パルス (1.2 kV, 35  $\mu$ F, 550  $\Omega$ ) を与え、すばやく 1 ml の YEP 培地を加えて 28℃ で 1 時間培養した。50  $\mu$ l ほどとって、50  $\mu$ g/l のハイグロマイシンを含む YEP 固体培地に塗布し、28℃ で 2 日間、暗黒下で培養した。生えてきた単コロニーを再び 50  $\mu$ g/l のハイグロマイシンを含む別の YEP 固体培地に白金耳を用いて軽く広げ、28℃ で 24 時間培養した。この菌液の一部をとり、50  $\mu$ g/l のハイグロマイシンを含む YEP 培地 5 ml に植菌し 28℃ で一晩振とう培養した。

## 【0075】

## 実施例3

(1) タバコ培養細胞への転写活性化因子を含むコンストラクトの導入

上記実施例2で調製した、pIS1-35S/AB35S (IS1) , pIS2-35S/AB35S (IS2) 及び pIS12-35S/AB35S (IS12) の各コンストラクトをそれぞれ導入したA. tumefaciens (以下、形質転換A. tumefaciensという) を用いて、タバコ培養細胞にコンストラクトIS1, IS2及びIS12をそれぞれ導入した。またコントロールとしてpAB35S (35S) を導入したA. tumefaciensを用いて同様に実験を行った。

## 【0076】

まずYEP 液体培地 5 ml 中で培養した上記形質転換 A. tumefaciens を 50 ml 遠心管に移し、3,000 rpmで 10 分間遠心分離した。上清を捨て、Linsmaier & Skoog 培地 (Linsmaier, E.M. and Skoog, F.; Physiol. Plantarum 18, 100-127 (1965); 以下 Lins 培地 という) を 25 ml 加えて懸濁し、再び 3,000 rpmで 10 分間、室温で遠心した後、上清を捨てた。この操作を 4 回繰り返し、集菌した A. tumefaciens に、 $OD_{600} = 0.2$  となるように Lins 培地を加えて懸濁し、これに  $10 \mu\text{g} / \text{ml}$  となるようにアセトシリコンを加えて再び懸濁した。

## 【0077】

一方、各コンストラクトを導入するタバコ培養細胞 BY-2 (東京大学大学院理学系研究科・長田敏行博士から分与) としては、予め 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2,4-D) を含む Lins 培地 45 ml で培養し、一週間ごとに懸濁培養細胞液 1 ml を新しい Lins 培地に植え継ぎ、植え継いでから約 100 時間経過し、対数増殖期にはいった細胞を使用した。

## 【0078】

当該タバコ培養細胞 BY-2 (4 ml) を 90 mm 滅菌シャーレにまき、その上から上記の操作で洗浄した形質転換 A. tumefaciens を  $100 \mu\text{l}$ 、均一になるように加えた。軽く混合した後、暗黒下、 $22^\circ\text{C}$  で 3 日間共存培養した。

## 【0079】

その後、該培養細胞液に 12 ml の Lins 培地を加えて懸濁し、50 ml 遠心管に移して、1,000 rpm で 1 分間遠心分離した後、上清を捨てた。この操作を 4 回繰り返し返した。その後クラフツを  $250 \mu\text{g} / \text{ml}$  含む Lins 培地を 12 ml



加えて更にもう一度同様の操作を行った。上清を捨てた後、沈殿した細胞に約 2 5 ml の Lins 培地を加えて懸濁し、血球検査板を用いて培地 0.25  $\mu$ l 中の細胞数を計測した。1 枚のプレート当たりの細胞数が  $4 \times 10^5$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^5$ ,  $10 \times 10^5$ ,  $15 \times 10^5$  となるように、100  $\mu$ g / ml または 300  $\mu$ g / ml のカナマイシンを含む Lins 固体選択培地 (クラフオラフ 250  $\mu$ g / ml 含む) に均一に播いて、暗黒下、28  $^{\circ}$ C で、培養した。1ヵ月後、プレート上に生じた遺伝子導入タバコ培養細胞 (形質転換カルス) の数及び形成率を計測した。結果を表 1 および図 12 に示す。

【0080】

【表1】

カナマイシン添加培地におけるタバコ培養細胞  
BY-2から生じた形質転換カルス数とその形成率

カナマイシン 100 $\mu$ g/ml				
細胞数 ( $\times 10^5$ )				
IS1	IS2	IS12	3SS	(コントロール)
4 $\pm$ 0 (0.10)	10 $\pm$ 7 (0.25)	16 $\pm$ 3 (0.40)	3 $\pm$ 2 (0.08)	40 $\pm$ 8 (0.67)
20 $\pm$ 4 (0.33)	72 $\pm$ 13 (1.20)	70 $\pm$ 6 (1.67)	47 $\pm$ 2 (0.59)	83 $\pm$ 13 (0.83)
43 $\pm$ 3 (0.54)	84 $\pm$ 4 (1.05)	124 $\pm$ 16 (1.55)		
99 $\pm$ 10 (0.99)	137 $\pm$ 12 (1.37)	220 $\pm$ 4 (2.20)		
細胞数 ( $\times 10^5$ )				
4	6	8	10	

カナマイシン 300 $\mu$ g/ml				
細胞数 ( $\times 10^5$ )				
IS1	IS2	IS12	3SS	(コントロール)
0 (0.00)	0 (0.00)	2 $\pm$ 1 (0.05)	0 (0.00)	0 (0.00)
3 $\pm$ 0 (0.05)	4 $\pm$ 2 (0.07)	15 $\pm$ 1 (0.25)	0 (0.00)	37 $\pm$ 16 (0.37)
10 $\pm$ 3 (0.13)	36 $\pm$ 4 (0.45)	41 $\pm$ 2 (0.51)	3 $\pm$ 2 (0.04)	
20 $\pm$ 5 (0.20)	72 $\pm$ 11 (0.72)	89 $\pm$ 5 (0.89)		
細胞数 ( $\times 10^5$ )				
4	6	8	10	

上段：形成カルス数 (個)  
下段：形成率 ( $\times 10^{-2}\%$ )

【0081】

この結果から、タバコ培養細胞にコンストラクトIS2またはIS12を挿入することによって、カナマイシン含有培地での形質転換カルスの形成率が上昇すること



【0085】

GUS 遺伝子の発現は、まず、複数の形質転換タバコ・カルスよりランダムに独立のカルスを選び、そのカルスから核 DNA を抽出してサザン解析法によって遺伝子導入がなされていることを確認し、次いでそのカルス・タンパク質を抽出し、GUS 活性を測定することによって行った。具体的には、形質転換したタバコ・カルスを 0.75 g とり、GUS - Light ( Tropix ) を用いて蛋白質を抽出した。Bio - Rad プロテインアッセイキットを用いて蛋白質濃度測定を行った後、GUS - Light ( Tropix ) 及びルミノスター-Lumat LB9501 ( ベルトール・ドジヤ・ソ ) を用いて 5 秒間 GUS 活性を計測した。結果を図 13 に示す。なお、図中縦軸に示す GUS 活性は、ルミノスターで得られた発光量をタンパク質量で割った、蛋白質あたり発光量として示したものである。

【0084】

(2) 形質転換タバコ・カルスにおける GUS 活性の測定

上記の結果に基づいて、挿入した上記コンストラクトが構造遺伝子の発現を高めているかどうかを確認するために、コンストラクトとして上記 pIS12-35S/AB35 S (IS12) を用いて、レポーターである GUS 遺伝子の発現を調べた。

【0083】

特に培地のカナマイシン濃度が  $300 \mu\text{g} / \text{ml}$  の場合において、コンストラクト IS2 または IS12 を導入することによって形質転換カルスの形成効率がコントロール (35S) の 10 倍以上になることが観察された。このことは、コンストラクト IS2 または IS12 が挿入されることによって、その近傍乃至は周辺領域にある、カナマイシン耐性を示す ntpII 遺伝子の発現が高まることを示唆するものである。

【0082】

、並びにその形成率はこれらのコンストラクトが挿入されていないタバコ培養細胞 (35S) の形質転換カルの形成率よりも高いことがわかった。具体的には、コンストラクト IS2 または IS12 が導入された形質転換カルス (遺伝子導入タバコ培養細胞) の形成率は、これらのコンストラクトが導入されていないコントロール (35S) よりも 1.6 ~ 2.6 倍高かった。

図 13 からわかるように、形質転換タバコ・カルスにおいてコンストラクト IS12 を挿入したものが、コンストラクトを含まない pAB35S (35S) を挿入したコントロールと比較して、平均して約 2.6 倍 GUS 活性が上昇しており、このことからコンストラクト IS12 の挿入によって有意に GUS 遺伝子の発現が高まること

が判明した。

【0086】

これは、すなわち 上記コンストラクトに含まれる各因子 (IS1 因子、IS2 因子、及びこれらの因子の結合体 (IS12 因子等)) が転写活性化因子であることを示すものである。

【0087】

実施例 4 タバコ植物体(葉)への転写活性化因子を含むコンストラクトの導入 (リーフディスク法)

実施例 2 で調製した、コンストラクト pIS1-35S/AB35S (IS1)、pIS2-35S/AB35S (IS2) 及び pIS12-35S/AB35S (IS12) を導入した *A. tumefaciens* (以下、形質転換 *A. tumefaciens* という) を用いて、リーフディスク法で、タバコ葉にコンストラクト IS1、IS2 及び IS12 をそれぞれ導入した。またコントロールとして上記コンストラクトを含まない pAB35S (35S) を導入した *A. tumefaciens* を用いて同様に実験を行った。

【0088】

具体的には、まずタバコ (SR1) の葉を 10 % 次亜塩素酸溶液に浸け、ヌタラーで軽くかき混ぜながら 2 分間葉さじで気泡をとり、液を新しくして更に 5 分間同様の操作を行なった。葉を取りだし滅菌水につけて軽くかき混ぜた。次亜塩素酸溶液を新しい溶液に置き換えて、同様の操作を計 3 回行なった。滅菌したパータオルを用いて軽く水気を除いた後、コルクボーラーで葉をくりぬきリーフディスクとし(葉脈は除く)、これを 10 ml の滅菌水につけた。このようにして調製したリーフディスクを、YEP 培地 5 ml で培養した上記形質転換 *A. tumefaciens* (滅菌水で  $OD_{600} = 0.25$  に調整したもの) 中に 1 分間浸けた。次いで、リーフディスクと菌液を滅菌パータオルにあげ、別の滅菌パータオルで水分を除いた。

を含むことにより、シュートの再生効率がコンストラクトを含まないコントロール (35S) の約 1.4 倍になり、特に ISI と IS2 の両方をタングラムで含む場合 (ISI2) はコントロールの約 2 倍のシュートが得られた。このことから、本発明の因子 (ISI 因子、IS2 因子及びこれらの結合体 (ISI2 等)) は、タバコ植物体において、該因子の近傍乃至は周辺領域にあるカナマイシン耐性遺伝子 (nptII 遺伝子) の活性を高めることがわかる。この結果は、本発明の因子が転写活性化因子であるとする上記実施例 3 の判断を支持するものである。

## 【0092】

## 実施例 5 ニンジン不定胚への転写活性化因子を含むコンストラクトの導入

実施例 2 で調製した、各コンストラクト pISI-35S/AB35S (ISI) , pIS2-35S/AB35S (IS2) 、pISI2-35S/AB35S (ISI2) 及び pMU3-35S/AB35S (MU3) を導入した A. tumefaciens (以下、形質転換 A. tumefaciens という) を用いて、ニンジン不定胚に各コンストラクト ISI, IS2, ISI2 及び MU3 をそれぞれ導入した。またコントロールとして上記コンストラクトを含まない pAB35S (35S) を導入した A. tumefaciens を用いて同様に実験を行った。

## 【0093】

具体的には、まずニンジン胚軸を約 1 cm ずつに切断し  $4.5 \times 10^{-6}$  M の 2,4-D (2,4-ジクロロペンチン酸: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid) を含む MS 培地に入れ暗黒下で 24 時間培養した後、2,4-D を含まない MS 培地に入れ暗黒下で 3 日間培養した。培地を替えて同様に 7 日間培養し、ニンジン不定胚を作成した。

## 【0094】

一方、YEP 培地 5 ml で培養した上記形質転換 A. tumefaciens を 3,000 rpm で 10 分間遠心し、上澄みを除いて MS 培地を約 30 ml 加えて懸濁した。この操作を 2 回繰り返して YEP 培地を完全に除いた。その後 3,000 rpm で 10 分間遠心して上澄みを除き、10 mg / l のアセトシリングを含む MS 培地を加えて  $OD_{600} = 0.3$  前後になるように調整した。

## 【0095】

これに網を用いて集めた上記のニンジン不定胚を加え 5 分間軽く振とうした。

滅菌パーパータオルで不定胚の水分を除き、10 mg/L のアセトシリントンを含む MS 培地に浸けて 22℃ で 3 日間、暗黒下で培養した。滅菌パーパータオルで不定胚の水分を除き、500 μg/L のカルベニシリンを含む MS 培地に浸して軽く振るようにして洗い、同様に水分を除去した後 500 μg/L のカルベニシリン及び 100 μg/L のカナマイシンを含む MS 寒天培地 (0.8% 寒天を含む) において暗黒下で培養した。1.5～2 カ月後、カルスを再生したヒポチルの数を計測した。結果を表 3 に示す。

【0096】

【表3】

カルスを再生したニンジンヒポチルの数の比較

	35S	IS1	IS2	IS12	MU3
+ 2,4-D	5	6	10	9	8
カルスを再生した下胚軸の数	78	56	60	61	63
再生率	6.4	11	17	15	13
(%)					
- 2,4-D	3	9	12	6	4
カルスを再生した下胚軸の数	77	62	62	64	58
下胚軸の総本数	3.9	13	19	9.4	6.9
再生率					

【0097】

表 3 からわかるように、ニンジン不定胚についても、タバコ・カルスの場合と同様に、2,4-D を含む培地 (+2,4-D) で培養した脱分化の増殖条件下、並びに2,4-D を含まない培地中 (-2,4-D) で培養した分化の増殖条件下のいずれも培養条件下においても、コンストラクト IS1, IS2, IS12 及び MU3 の挿入によって再生効率の向上が見られた。もっとも再生効率の向上が見られたのはコンストラクト IS2 が挿入されたニンジン不定胚であった。

【0098】

実施例 6 イネへの転写活性化因子を含むコンストラクトの導入

実施例 2 で調製した、コンストラクト pIS1-35S/AB35S (IS1) 及び pIS2-35S/A B35S (IS2) を導入した A. tumefaciens (以下、形質転換 A. tumefaciens という) を用いて、イネ種子にコンストラクト IS1 及び IS2 をそれぞれ導入した。またコントロールとして上記コンストラクトを含まない pAB35S (35S) を導入した A.

tumefaciensを用いて同様に実験を行った。

【0099】

具体的には、まずイネ完熟種子（日本晴）の中から形、色などが正常なものを選抜し、乳鉢で軽く擦り、粉を取り除いた。50 ml のフアルコンチューブに粉をとり除いた種子を入れ、2.5% 次亜塩素酸ナトリウムを加え、100~120 rpm で 20 分間振とうした。その後上澄みを捨て滅菌水を加え、穏やかに振とうした。この操作を 3 回繰り返した後、種子をカルス誘導培地に置いた。これを 28℃、暗黒下で培養した。

【0100】

3~4 週間後、胚盤がカルス化し、黄色化したシュートが伸びてきたカルスの中で、直径 2~3 mm で数個がこぼれ落ちているようなものを新しいカルス誘導培地に置き、28℃で 7 日間、暗黒下で培養した。

【0101】

一方、上記形質転換 *A. tumefaciens* を YEP 固体培地に植菌し、28℃で 3 日間、暗黒下で培養した。葉さじを用いて *A. tumefaciens* をかきとり、アセトシリングンを 40 mg/l 補填した AAI 培地 (Toriyama, K. and Hirata, K.; Plant Science 41, 179-183 (1985)) に加えて  $OD_{600} = 0.18 \sim 0.2$  に調整した。これを 25℃で 1 時間、暗黒下で振とう培養した。

【0102】

上記で培養したイネ・カルスを滅菌した茶こしに入れ、培養した上記 *A. tumefaciens* 懸濁液を加えた。カルス全体が浸るように茶こしを時々揺すりながら 3 分間振とうした後、茶こしで滅菌したペーパータオルの上にのせ、余分な菌液を除いた。カルスを共存培養培地に置き、25℃で 3 日間、暗黒下で培養した。

【0103】

次いで共存培養したカルスを茶こしに集め、クワフオソを 500 mg/l 加えた滅菌水に浸して茶こしを揺すり *A. tumefaciens* を洗い落とした後、茶こしで滅菌したペーパータオルの上にのせ、水分を除いた。同様の操作を計 4 回行った。カルスを選抜培地に置き、28℃、暗黒下で培養した。3~4 週間後、多数

のカルスからラジウムを選び出し、カルスの一部をとってGUS 染色液 (0.75 mM X-Guc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucronic acid), 0.5 mM フェリシアン化カリウム, 0.5 mM フェロシアン化カリウム, 0.3% Triton X-100, 20% メタノール, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) ) に入れ、37℃、一晩反応させ、GUS 活性を検出した。カルスが青く染色されGUS 活性が検出されたカルスが遺伝子導入された形質転換イネ・カルスである。その結果を表4に示す。

【0104】

【表4】

イネ・カルの GUS 染色結果

	35S	IS1	IS2
染まったカルス (個)	27	38	44
カルス総数 (個)	275	244	228
形質転換カルスが全体に占める割合 (%)	9.8	15.6	19.3

【0105】

表4の結果からわかるように、コンストラクトIS1及びIS2の導入によってそれぞれコントロール (35S) の約1.5倍及び約2倍、形質転換効率が増加することを確認された。こがみられ、これらIS1 および IS2 が単独で形質転換効率を高めることが示された。

以上の実施例1～6から本発明の転写活性化因子 (IS1、IS2、IS12、MU3) を用いることによって、再生効率 (形質転換効率) が高まること示された。その理由としては、次の3つの可能性が考えられる。

- ① Ti-plasmid の植物細胞への導入効率が高くなった可能性、
- ② nos-プロモーターの活性がIS1 または／および IS2因子 によって上昇したために nptII 遺伝子の転写が促進されて多量の遺伝子産物が生産されたために、選抜に用いたカナマイシン含有培地で生育できる細胞の数が増え、その結果細胞からの再生効率が高くなった可能性、
- ③ IS1 または／および IS2因子 がこれらを含む近傍乃至は周辺の遺伝子領域の

活性化を行うか、もしくは該遺伝子領域が不活性化することを防いでいる可能性

【0106】

Ti-plasmid による遺伝子の導入は植物染色体の決まった位置に挿入されることではなく、どこに挿入されるかは決まっていない。このため、染色体の構造によって決定している active site に挿入されるか、あるいはガン DNA のメチル化などによってその近傍の遺伝子が不活性化されてしまっている cryptic site に挿入されるかは偶然による。もしも導入遺伝子が cryptic site に挿入された場合には、その染色体の『場』の影響を受けるため、その導入遺伝子も不活性化されると考えられている。

【0107】

上記の実施例において用いたコンストラクトは、本発明の転写活性化因子 (IS1 またはノボIS2因子) が nptII 遺伝子 (カナマイシン耐性遺伝子) のターミナーター側、すなわちカナマイシン耐性遺伝子のnos-プロモーターの反対側に挿入されたものである。従って、これらの因子がカナマイシン耐性遺伝子のプロモーターにシスに作用することはない。

【0108】

しかし上記の実施例から、本発明の転写活性化因子がnos-プロモーターに直接作用できない位置に挿入された状況でも、タバコ培養細胞においてカナマイシン耐性細胞 (形質転換タバコ・カルス) の数が増加すること、特に培地中のカナマイシン濃度が 300 mM と高い場合においてもカナマイシン耐性細胞の数が多くなること (実施例 3 (1)) が示され、また上記コンストラクトを種々の植物種の植物細胞に導入することによってカナマイシン耐性を示す植物の再生効率が高まる (実施例 4~6) という結果が得られた。この結果は、IS1 またはノボIS2 因子が、nos-プロモーターに対して直接シス活性化を引き起こす態様ではなく、該因子の近傍に位置するカナマイシン耐性遺伝子に働きかけることによって該カナマイシン耐性遺伝子の活性を維持した (活性化と不活性化抑制の両者の意味を含む) 細胞数が多くなったことを示す。すなわち、これは、本発明の転写活性化因子は、エンハンサーとして特定の遺伝子のプロモーターの近傍に存在して該ノ

ロモーターにシスに作用することによって転写を活性化する従来の転写活性化因子とは異なり、該因子がゲノム遺伝子に挿入されることによってそれが挿入された近傍および周辺領域の単一ないしは複数の遺伝子群に作用して（作用する遺伝子のプロモーターに対する位置および方向に関係なく）、転写活性を促進するといった上記③の機能を有する転写活性化因子であることを示すものである。

## 【0109】

また前記実施例で用いたコンストラクトは、ISIまたは／およびIS2因子がGUS遺伝子の35S-プロモーターの側に挿入されてなるものである。実施例3（2）において、当該コンストラクトを導入したタバコ培養細胞のGUS活性が上昇したことから、本発明の転写活性化因子がその下流近傍に位置する35Sプロモーターにも作用してGUS遺伝子の転写活性を上昇させることが明確になった。この結果は前述する判断を支持するものであり、本発明の転写活性化因子が上記③の作用、すなわち「ISIまたは／およびIS2因子がこれらを含む近傍の遺伝子領域の活性化を行うか、もしくは該遺伝子領域が不活性化することを防いでいる」ことを示すものである。

## 【0110】

また上記実施例において、本発明の転写活性化因子を用いることによって、培養細胞のみならず（実施例3）、植物体についても実際に、タバコ・リーフティス法におけるタバコ植物体の再生効率が高まること（実施例4）、ニンジンおよびコチルからの植物体再生のもとになるエンゾリオジェニック・カルスの形成効率が高まること（実施例5）、イネの植物体再生のもとになるカルスの形成効率が高まること（実施例6）が示された。これらの結果は、植物のゲノム遺伝子に導入した外来遺伝子が位置効果によってジーン・サイレンシング（不活性化）されてしまい、植物体の再生やカルスの形成ができなくなってしまう植物細胞に対して、本発明の転写活性化因子がその植物体の再生効率や形成効率を高めることができ、実用性の上でも有用であることを示すものである。

## 【0111】

また最近、MITEがMARと同様に核マトリクスに結合することが示された（Tkachuk et al., Plant Cell 12 : 249-264 (2000)）ことから、MITEは核内でMARと



同様な役割を果たしているものと考えられる。このことから、本発明の転写活性化因子である MITE によれば、遺伝子組み換え植物の作出に単独で用いるのみならず、MAR 等の因子と組み合わせて用いることによって、植物体の再生効率や形成効率をさらに高めることができるものと期待できる。

【0112】

【発明の効果】

遺伝子組み換え植物の作出において、克服すべき最も重要な問題は、外来遺伝子の発現不活性化をもたらすジーン・サイレンシング現象である。遺伝子組み換え植物の開発においては、ジーン・サイレンシング現象を回避するために、非常に数多くの植物個体の中からジーン・サイレンシングをなるべく引き起こさない位置に外来遺伝子が挿入された植物個体を選抜する必要がある。

【0113】

本発明における転写活性化因子 (IS1 因子 または / および IS2 因子) は、一面において、植物における遺伝子導入において位置効果 (position effect) による遺伝子発現の不活性化現象 (ジーン・サイレンシング現象) を抑制し解消する作用を有する因子であると考えられる。従って、本発明の転写活性化因子を遺伝子組み換え植物の作出に単独もしくは核 DNA 構造に関与する MAR (matrix attachment region) 等の他の因子と組み合わせて用いることによって、遺伝子の発現を安定に行うことができ、その結果、遺伝子導入後に通常行うスクリーニングの回数および育種すべき組み換え植物体の誘致を顕著に減らすことが可能になると期待される。

【0114】

ユリ、キク、コムギ等のようなザノム・サイアスが大きい植物は、ザノム内における不活性化領域 (cryptic site) も大きいため、導入した外来遺伝子の殆どが不活性化領域に挿入されてしまう。このため、かかる植物については遺伝子組み換え植物体の作出が非常に困難で、實際上不可能であった。しかしながら、本発明の転写活性化因子によれば植物のザノム遺伝子に導入された外来遺伝子がサイレンシングされるのを有意に抑制することができるため、上記のように従来遺伝子組み換えが困難とされていた植物種に対しても効率よく外来遺伝子を導入する

ことができ、遺伝子組み換え植物体が作出できるものと期待される。

【0115】

また本発明の転写活性化因子は、それが挿入された遺伝子領域の近傍若しくは

周辺に位置する遺伝子を活性化（転写の活性化を含む）する作用を有する因子で

もあると考えられる。従って、本発明の転写活性化因子によれば、上記のような

ゲノム・サイズが大きいためにサイレンシングが頻発して遺伝子組換え植物体の

作出が困難であった植物における遺伝子組換えを実用化ならしめるのみならず、

これまでにすでに実用化されているダイズ、トウモロコシ、ジャガイモ、トマ

などの植物種における遺伝子組換えにおいても、たとえば除草剤耐性遺伝子、殺

虫タンパク質遺伝子などの有用形質遺伝子のプロモーター上流もしくはその近傍

にこの転写活性化因子を挿入して用いることによって、遺伝子導入効率が上昇す

るとともに、これら有用形質遺伝子の転写活性を上昇させることが可能になり、

従来法によって得られていた遺伝子組換え植物体の作成法より、さらに高生産・

高品質の遺伝子組換え植物体を作成することができるものと期待される。

【0116】

【配列表】

<110> Ozeki, Yoshihiro

<110> San-Ei Gen F.F.I., Inc.

<120> Enhancer of Transcription

<130> 14200JP

<150> JP 1999/206320

<151> 1999-07-21

<160> 14

<210> 1

<400> 2  
ctccctacgt cccatttat gtgacctcat ttcttttttg ggaagctca aaaaaataa  
60  
cctagaatac ttactatitt ttaacacat ttccaactat tacaccacc aactctatat  
120  
tttatactat ttatatatta aataaacact attacacca ctactttct ccaatactc  
180  
aaatcatta ttaaatatg ataggtccac cactttacc acttttcaac tacatttact  
240

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)  
<212> DNA  
<211> 299  
<210> 2

ggatctttt taaaaatacc catcgttaa atatttttt taaaaatac attgcaact  
60  
tcattgtttt taaaaatacc ttccaataa ttttttttt caaaaaatac attgcaact  
120  
tttgcaacct catttgcaac ctggggcggc gcagccgtaa agttgccag tgaagttgca  
180  
aaagttgcaa atgagtttgt aaaaagttgc aatgagttg caaaagttgc aaataaaaat  
240  
gaaaagttgc aacagttgca actgcaattg caactagttc aactgaaaac tgaagttgc  
300  
aaaaagttgca aatgagttg caactaaatg caactgaaa ctgtaagtaa caacagatgt  
360  
atgtgtgtcc cctggcgggg cgttagatt acaatagaat caactgaatg caatcatag  
420  
caactgaata caactatag caatcataa tgcattaca aatcctgatt tcaagttcca  
480  
gttttcgaat gtcatittcg aatcgtatat atatatatat atatatatat cgtttcgaa  
540  
aatgacattc gaaaaactgga acttgaaatc aggaattcag ctgcataaga agttgcaaaa  
600  
gagttgcaaa cagcgtgtgc gccgcctgta gtgcaaatg agttgcaaa agttgcaaac  
660  
agtatitttg aaaaaaagat ttatgaaaa gttattttta aaaaattc tgggaagtag  
720  
tatttttgaa aacaataaaa gaaaagtag gtatitttgt agatttccc  
769

<400> 1  
<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)  
<212> DNA  
<211> 769



acattttct taatccgt gaaagtcaaa ctcatcaca taaaatggga cagaggagag 299

<210> 3

<211> 1192

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 3

ggtaccgggc ccccccga ggtcacctcc tagtcccat ttatgtgac ctattttct 60  
tttgggacg tctcaaaaaa aataacctag aatactact atttttaac actatttttc 120  
actattacac ccaaccaact tatatttat actatttat tatataataa acaactattac 180  
accactact ttctccact atctcaaatc tatataaaa tatlgatagg tccacacatt 240  
taccacttt tcaactacat ttactacat ttcttaac tccgtgaaag tcaaacatcat 300  
tcacataaaa tgggacagag ggaattaata ttaatttaa tagacggtat cgataagctt 360  
atcgataccg tctcagattc gcaaacataa aaagaaaagg gatctttta aaaaatacca 420  
tctgtaaat tatttttta aaaaatactac catcttttc atgtttta aaaaatactt 480  
ttcataaat tttttttca aaaaatagat ttgcaacttt tgcacactca ttgcaacct 540  
tggcgggcg agccgtaaaa gtggccagt aggttgcaaa agttgcaaat gagtltgtaa 600  
aagltgcaaa tggggtlgca aagltlgca ataaaaagg aagltlgca cagltgcaac 660  
tgcaattgca actagttcaa ctgaaaactg taagltgcaa aagltgcaaa tggggtlgca 720  
actaaatgca actgaaaaat gtaagtaaca acagatgtat ggtgtgccc tggcggggc 780  
gttagattac aatagaatca actgaatgca atcatatgca actgaataca actatatgca 840  
atcatatatg caattacaaa tctgattc aagttccagt ttgcgaagt cattttcgaa 900  
atcgatatat atatatatat atatatatg atttgcaaaa tgcattcgaa aaactggaaac 960  
tgaatatcag gaattcagct gcataatgag ttgcaaaaaga ggttgcaaca cggctggcgc 1020  
cgccgttagt tgcaaaatgag gtggcaaaag ttgcaaacag tatlttgaa aaaaagattt 1080  
tatgaaaaag tatltttaa aataatctg gaaggtagta ttttgaaaa caataaaga 1140  
aaaagtaggt agttltgtag atttccaga cctcgagggg gggcccgta cc 1192

<210> 4  
<211> 8  
<212> DNA  
<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)  
<400> 4  
gttgcaaa

8

<210> 5  
<211> 8  
<212> DNA  
<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)  
<400> 5  
gttgcaac

8

<210> 6  
<211> 8  
<212> DNA  
<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)  
<400> 6  
tttgcaaa

8

<210> 7  
<211> 8  
<212> DNA  
<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)  
<400> 7  
tttgcaac

8

<210> 8

<211> 7

<212> DNA

<213> Carrot (Daucus carota L. cv. Kurodagosun)

<400> 8

tatgcaa

<210> 9

<211> 7

<212> DNA

<213> Carrot (Daucus carota L. cv. Kurodagosun)

<400> 9

aatgcaa

<210> 10

<211> 158

<212> DNA

<213> Carrot (Daucus carota L. cv. Kurodagosun)

<400> 10

ggatccttt taataatacc catcgttaa attatcttt taataatact accatcttt

60

tcattgtttt taataatacc ttltcataa tttttttt caaaaatacg atttgcaact

120

tttgcaacct catttgcaac ctggggcggc gcagccgt

158

<210> 11

<211> 158

<212> DNA

<213> Carrot (Daucus carota L. cv. Kurodagosun)

<400> 11

acgctggcg cggcctgtag ttgcaaatga ggtlgcaaaa gtlgcaaca gtatttga 60  
aaaaagatt ttatgaaaag gtatttttaa aaataatct ggaaggtagt attttgaaa 120  
acaataaag aaaaggtagg tagtttga gatltccc 158

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 12

ciccctagt cccatttat gtgacctcat tt 32

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 13

aaacatc acataaaatg ggaacagagg ag 32

<210> 14

<211> 1553

<212> DNA

<213> Carrot(Daucus carota L.cv.Kurodagosun)

<400> 14

gtaaccgggc ccccccicga ggtacatccc tagtcccat ttatgtgac ctcatlttct 60

tttgggagc tctcaaaaaa aataacctag aatactact atttttaac actatltttc 120

actattacac ccaaccaatc tataatttat actatlttat tattaataa acaattatc 180

accacact ttctccact atccaatc tattataa tatgatag tccaccact 240  
taccactt tcaactacat ttactacat ttcttaac tcgtgaag tcaacatc 300  
tcacataaa tgggacagag ggagtaata ttaatttaa taatlatat gtgatttga 360  
ttatgttg atcttgata aaatcacaca gattgatata aatcttaaa gatttaacca 420  
caatgttca aatctcata gatttagta gattcaaaa aatttaaat acgtcaaaa 480  
atcataaa atcatcat ttataaat caaaaaatc cagtaatat tgcacatcag 540  
atttaatga atttaaat gaacaatct agtgaatac catgatit taaatataa 600  
ttaaatc taatgaata caccagatt ttgaataata atttaaat ttaattgaat 660  
atcaagat ttaatat ttaataatc tcatctga tacaataaa tgcataaat 720  
ctgaatcca tactctct cagattcga aacataaaa gaaaagggat cttttaaaa 780  
ataccact gtaaatat tttttaaaa atactacat cttttcat gttttaaaa 840  
atactttc ataattt ttttcaaaa atcgaatt caactttgc aacctcatt 900  
gcaaccttg gggcgagc gtaaaagt gccagtgg ttgcaaaagt tgcataatgag 960  
ttgtaaaag tgcataatga gttgcaaaa gttgcaata aaaaatgaaa gttgcaacag 1020  
ttgcaactc aatgcaact agtcaactg aaaaactga gttgcaaaag ttgcaaatga 1080  
gttgcaact aatgcaact gaaaactga agtaacaca gatgtatgt gtgccccgtg 1140  
cgggcggt agattcaat agatcaact gaatgcaatc atatgcaact gaatacaact 1200  
atatgcaatc atatagca tacaatcc gtattcaag ttccagttt cgaatgcat 1260  
tttgaatc gatataata tatataata tatatcatt tcgaaaaatga cattgaaaa 1320  
ctgaaactg aaatcagaa ttcatgca tatgaattg caaaagagt tgcacacag 1380  
ctggcgccgc ctgtagtc aaatgagtt gcaaaagt tgcacagtat ttgaaaaa 1440  
agaatttat gaaaagtat ttttaaat aatctgaa gtagtatit ttgaaaaa 1500  
taaaagaaa gtagtagt ttgtagatt tccagacgg tatcgataag ctt 1553

【図面の簡単な説明】

- 【図1】本発明のM I T E様因子、I S 2 因子の構造を示す。  
【図2】本発明のM I T E様因子、I S 1 因子の構造、及びその末端逆反復配列、挿入重複配列（下線部分のT A）を示す。  
【図3】gDCPAL3-pro/SK の構築方法を示す概略図である。



【図 4】ニンジンの PAL 遺伝子 gDCPAL3 および gDCPAL4 との構造を比較した図である。

【図 5】本発明の M I T E 様因子 ( I S 1 因子 ) の塩基配列を、従来公知の Stowaway 属の塩基配列 (Bureau および Wessler, Plant Cell, 6 : 907-917 (1994)) と比較した結果を示す図である。黒字に白抜きの配列が相同性の見られる末端逆反復配列である。

【図 6】本発明の M I T E 様因子、I S 2 因子の末端に見られる不完全逆反復配列、挿入重複配列 (下線矢印部分の A A A G A A A ) を示す。

【図 7】I S 1-35S/SK の構築方法を示す概略図である。

【図 8】I S 2-35S/SK の構築方法を示す概略図である。

【図 9】I S 12-35S/SK の構築方法を示す概略図である。

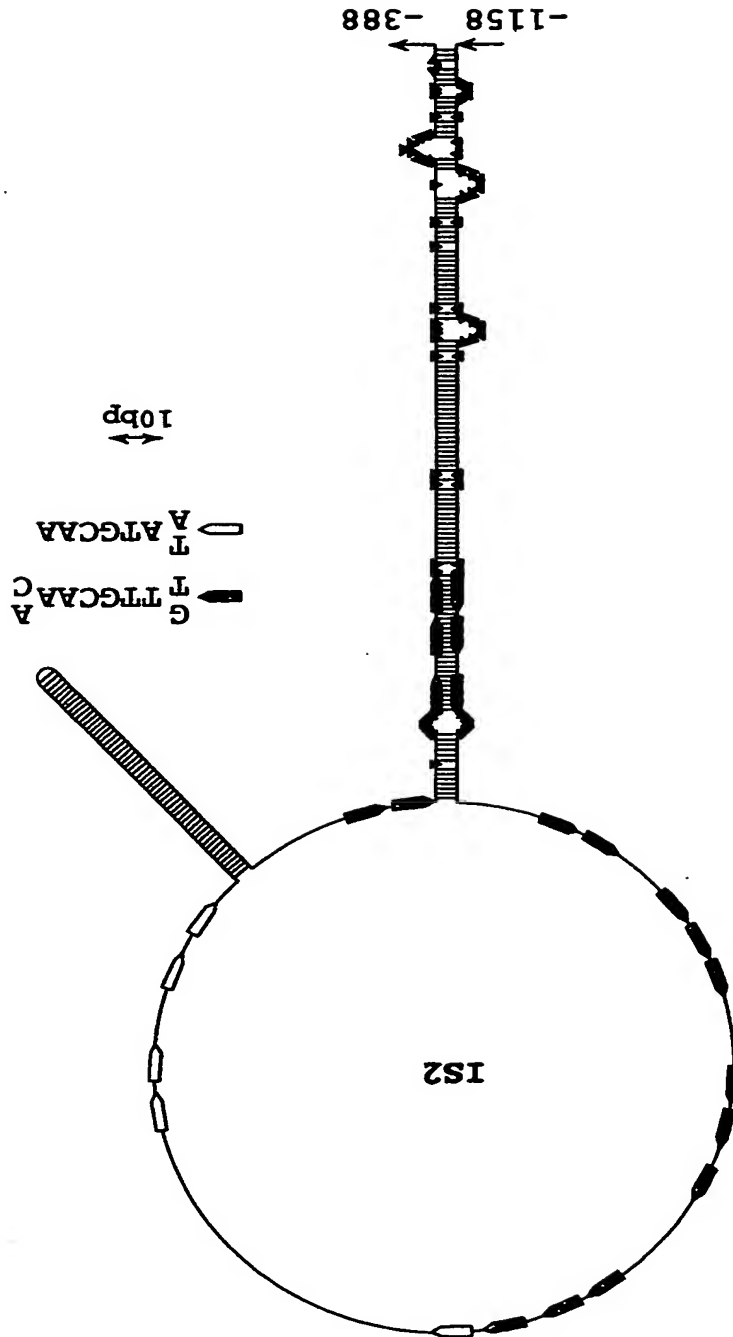
【図 1 0】M U 3-35S/SK の構築方法を示す概略図である。

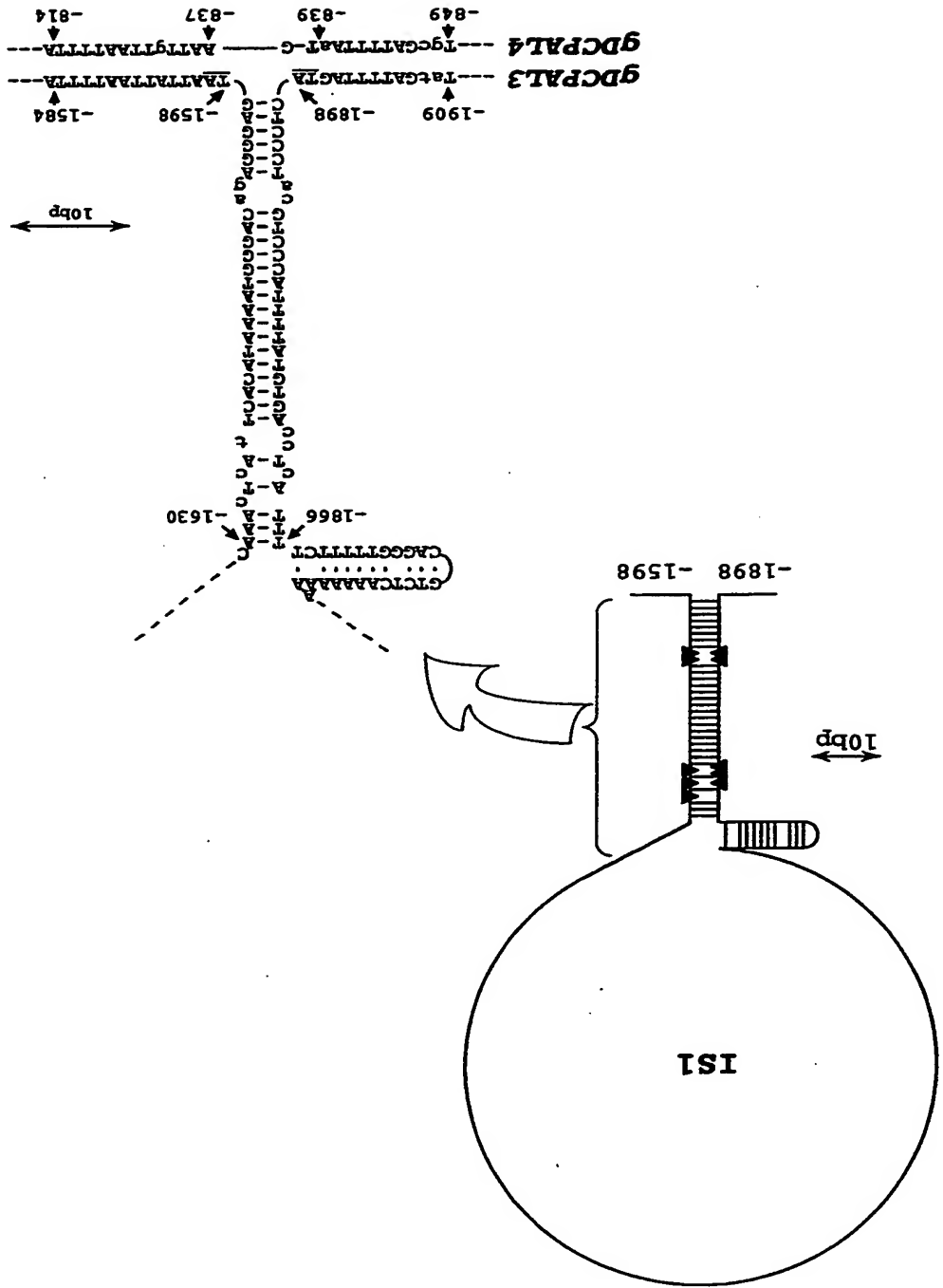
【図 1 1】P I S 1-35S/AB35S、P I S 2-35S/AB35S、P I S 12-35S/AB35S 及び P M U 3-35S/AB35S の構築方法を示す概略図である。

【図 1 2】選択培地 (カナマイシン添加培地) においてコンストラクト P I S 1-35S/AB35S (I S 1)、P I S 2-35S/AB35S (I S 2)、P I S 12-35S/AB35S (I S 12) 及び P A B 35S (35S) (コントロール) を導入した形質転換タバコ BY-2 培養細胞の再生カルス数を比較した実施例 3 (1) の結果を示す図である。なお、図の上段及び下段は、カナマイシンをそれぞれ 100  $\mu$ g/ml 及び 300  $\mu$ g/ml の割合で含有する選択培地を使用した結果を示す図である。

【図 1 3】P A B 35S (35S) を導入したタバコ・カルス (コントロール) の GUS 活性 (左図) および P I S 12-35S/AB35S (I S 12) を導入したタバコ・カルスの GUS 活性 (右図) を比較した実施例 3 (2) の結果を示す図である。

IS2 因子の構造



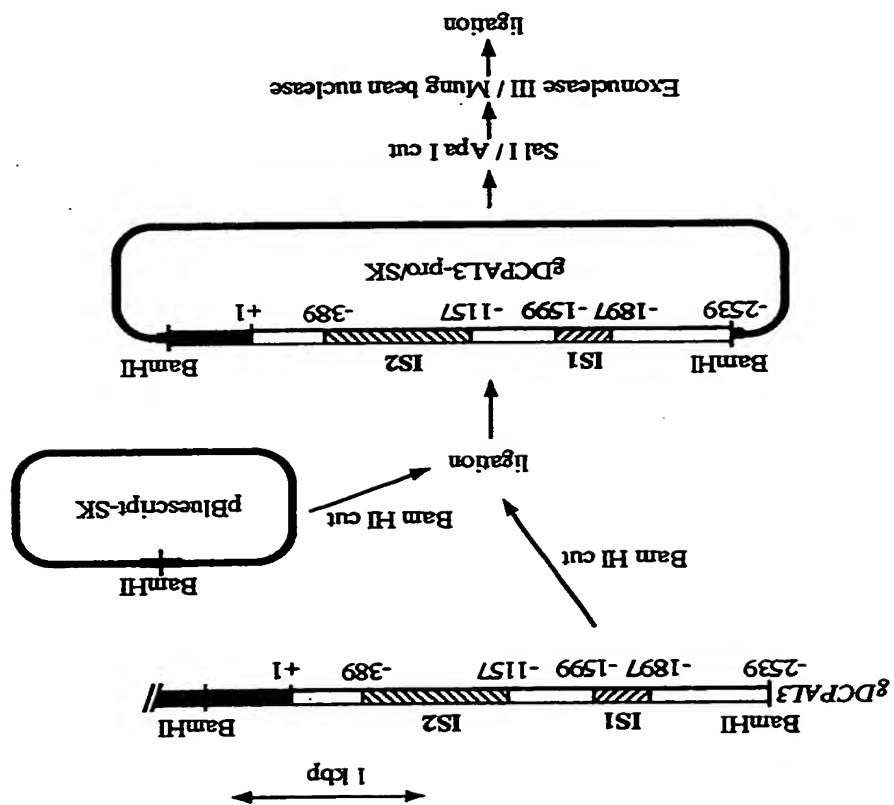


IS1 因子の構造

【図2】

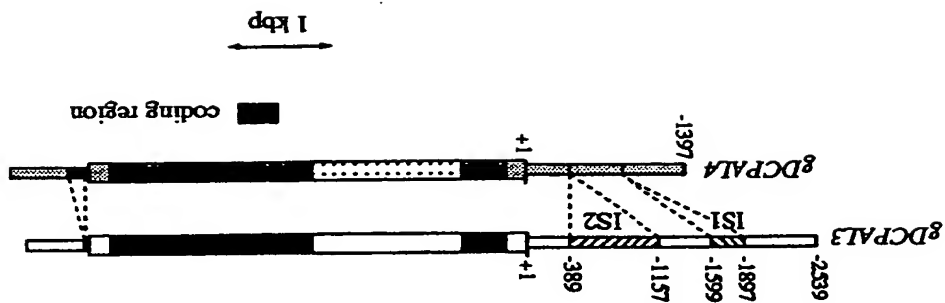
【図3】

ニンジン *gDCPAL3* 遺伝子からの IS1 因子および IS2 因子のクローニング



【図4】

ニンジン PAL 遺伝子 *gDCPAL3* および *gDCPAL4* の構造の比較

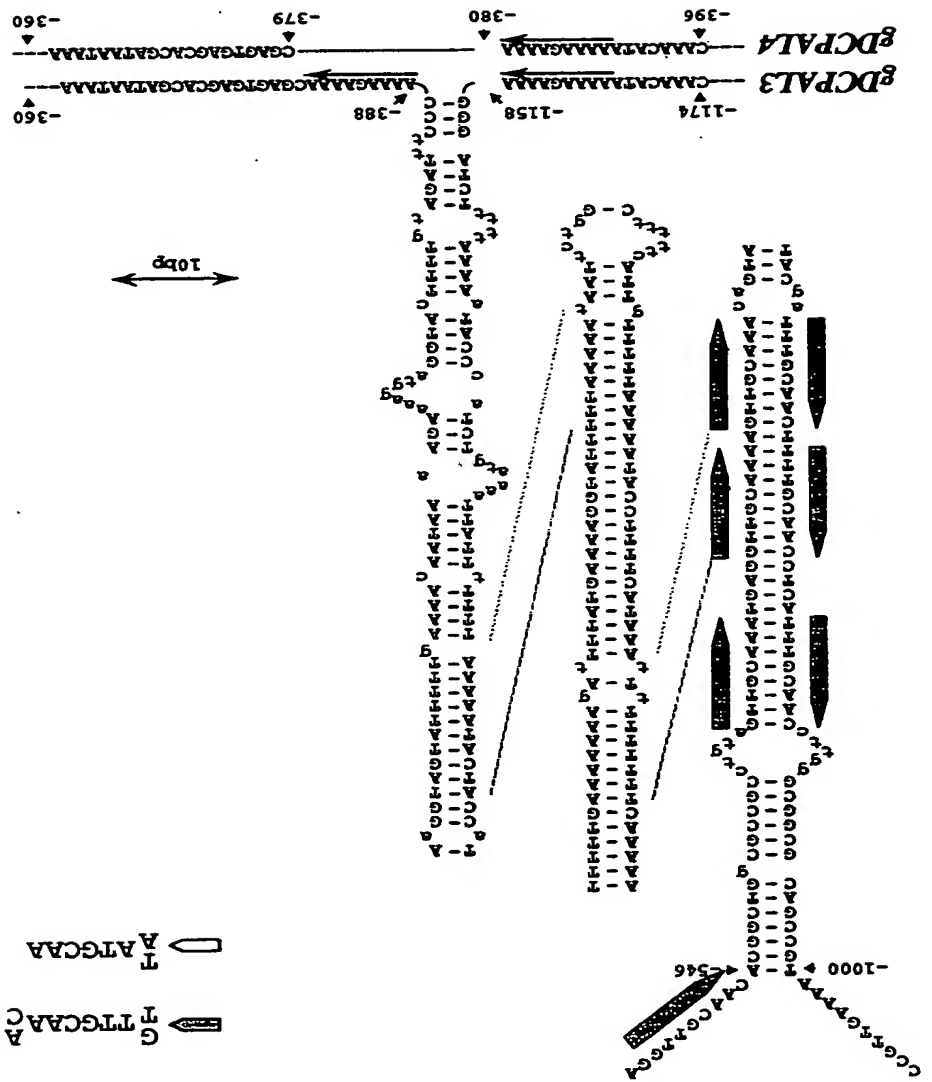


ニンジン PAL 遺伝子 *gDCPAL3* から見出された  
IS1 因子と既知の *Slowway* 遺伝子との相同性の比較

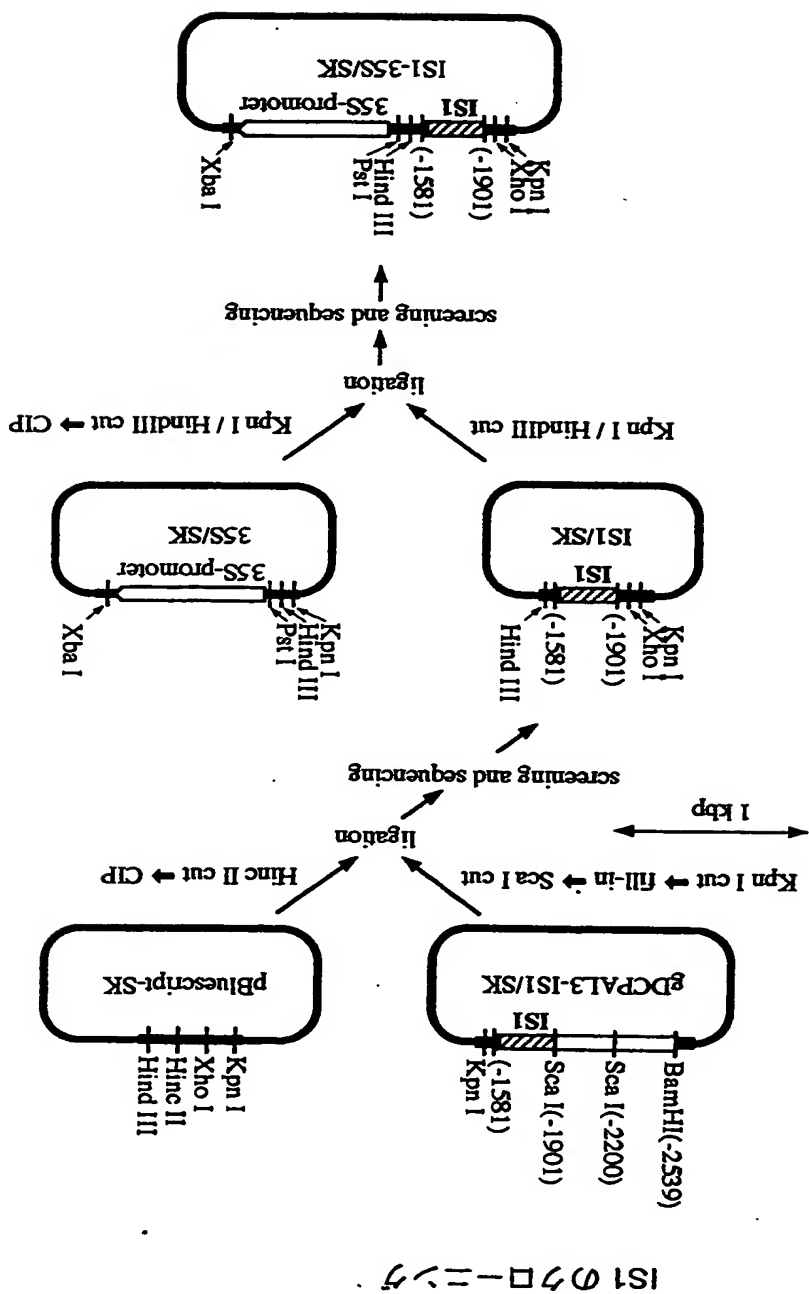
*Slowaway*

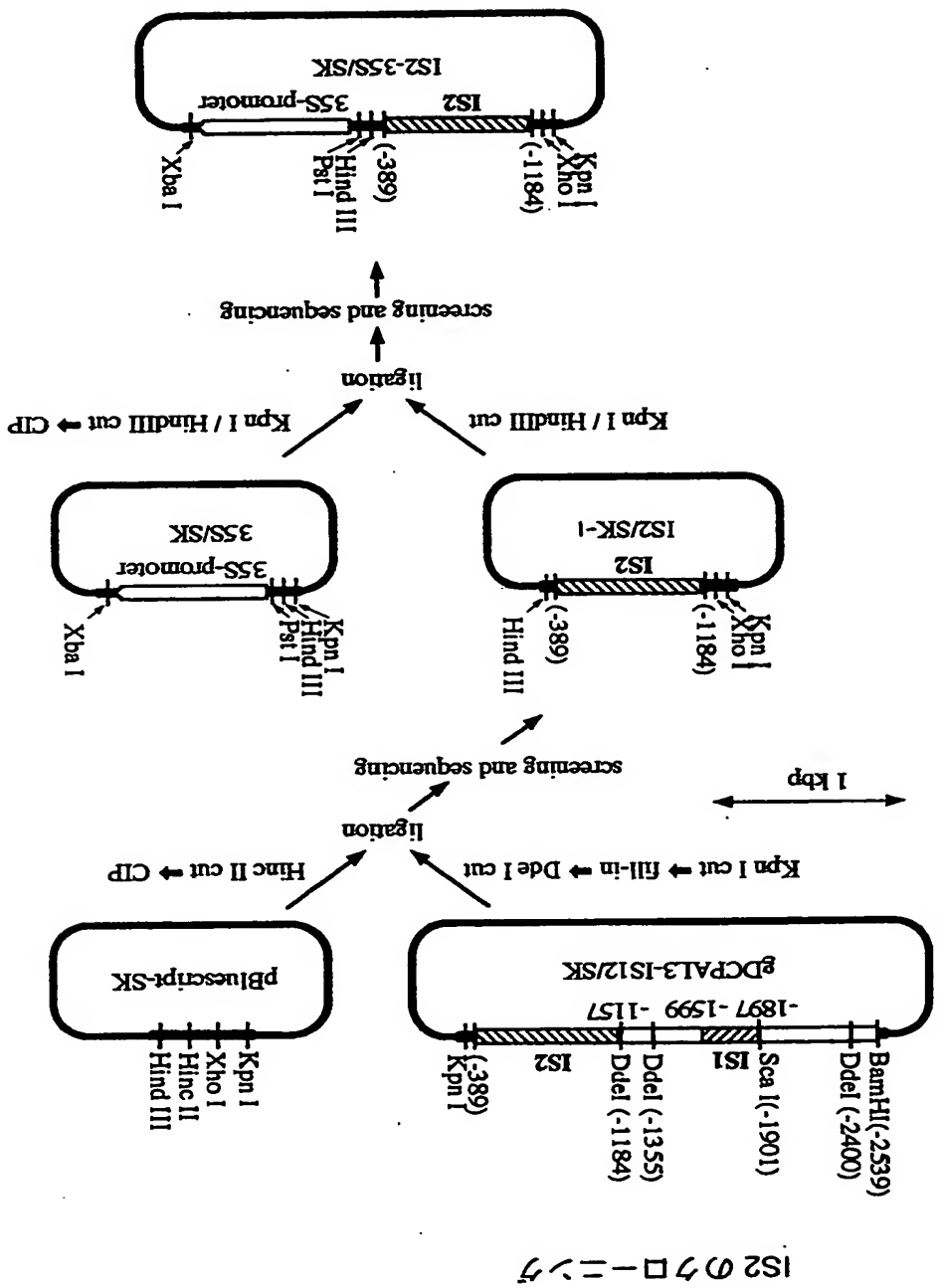
Gene	Position	size(bp)
IS1 因子	(5'-1597)	303
carrot DC8	(5'-514)	253
carrot DC8	(5'-409)	249
petunia CH8	(1n1 884)	122
tomato PAL	(5'-494)	248
paralely PR2	(5'-415)	243
tobacco CHN	(5'-209)	244
pea lectin	(5'-1296)	275
rape EPSP	(1n5 1835)	220
potato patatin	(1n2 922)	259
rice POMA	(5'-432)	122
maize zein	(3' UTR)	163
wheat AMT	(5'-458)	100
barley Rona	(1n3 839)	159
sugarcane P3P0	(1n6 2675)	267
sorghum P3P0	(5'-469)	255

IS2 因子の末端逆反復配列の構造と挿入部分の塩基配列



【図7】

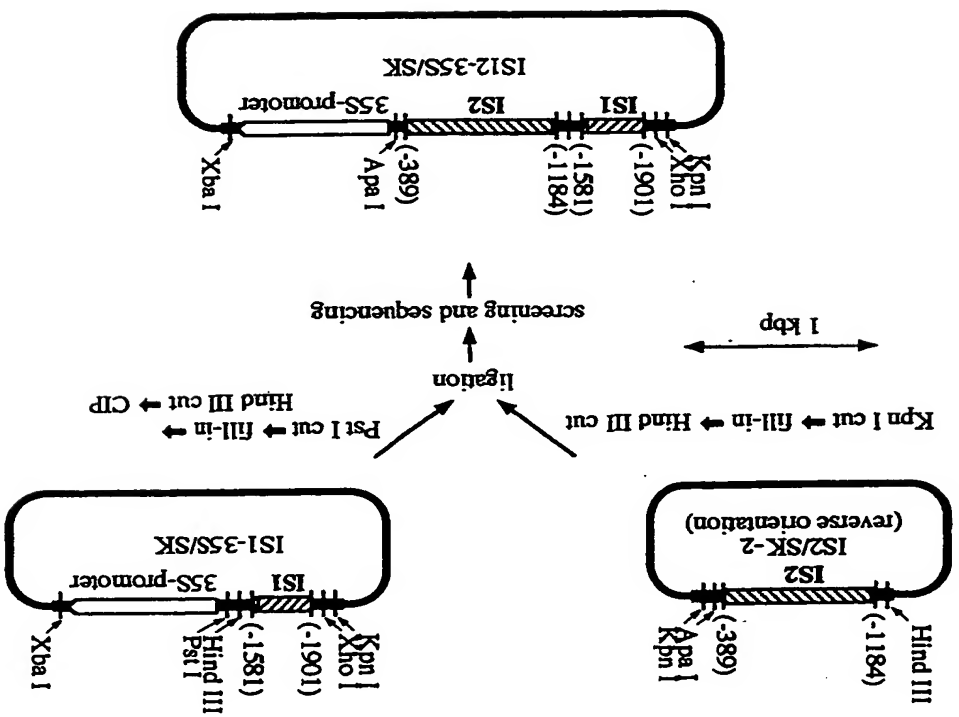


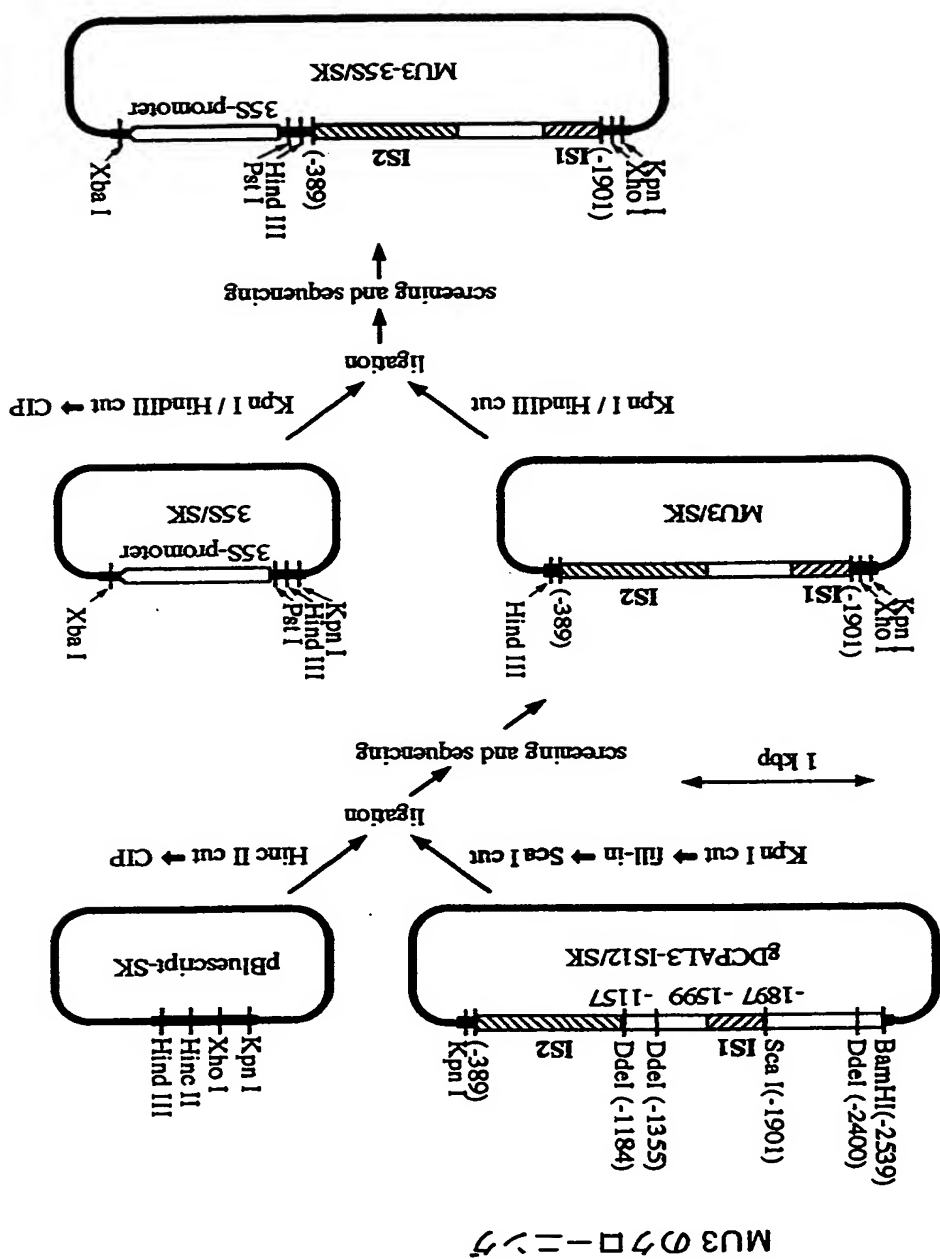




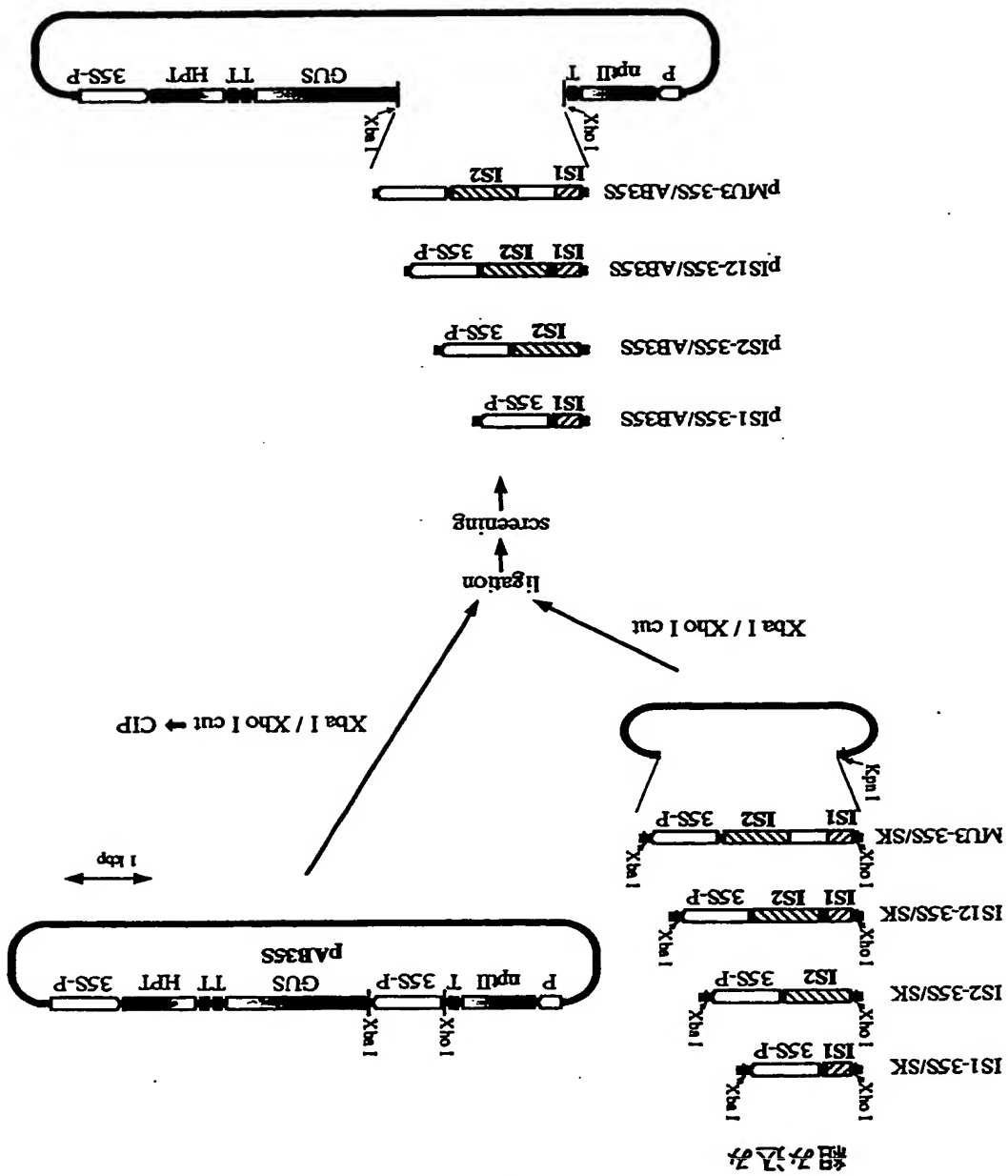
【図9】

IS12 のクローニング



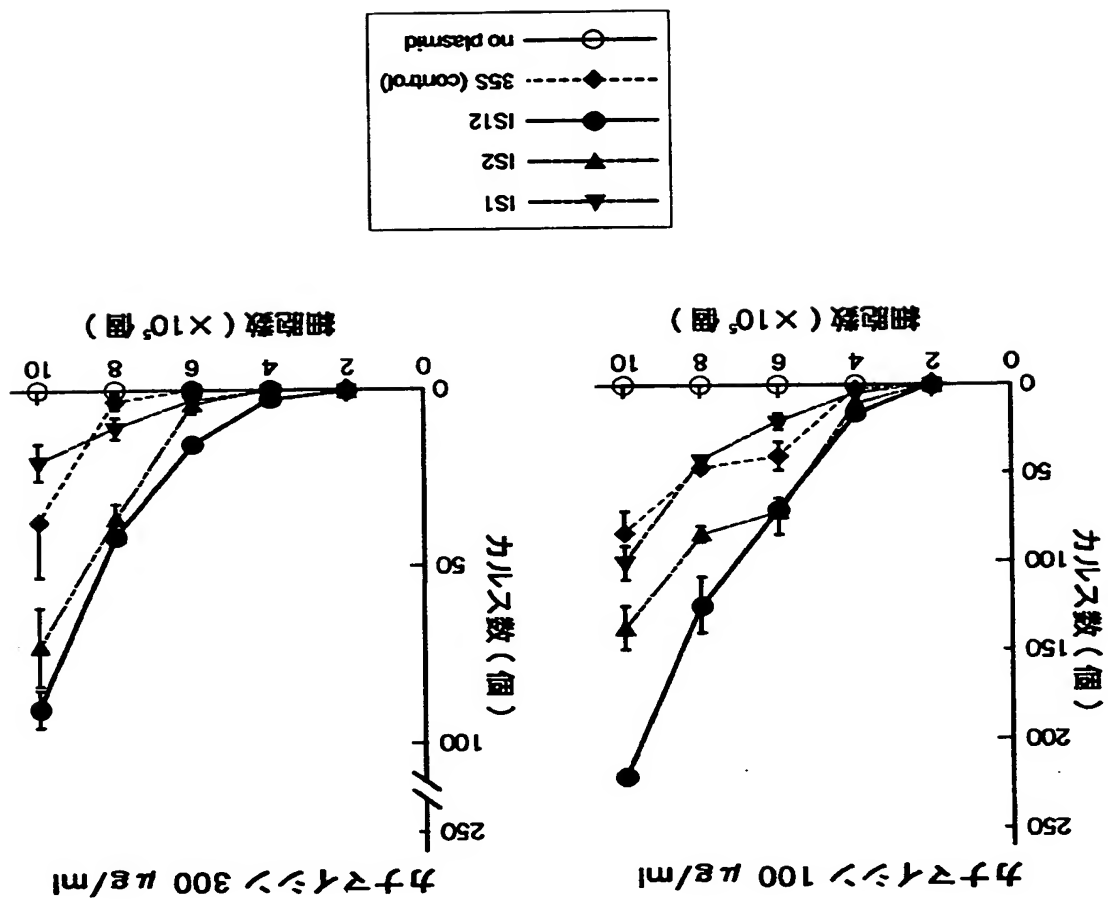


IS1, IS2, IS12 および MU3 の植物遺伝子発現ベクターへの組み込み



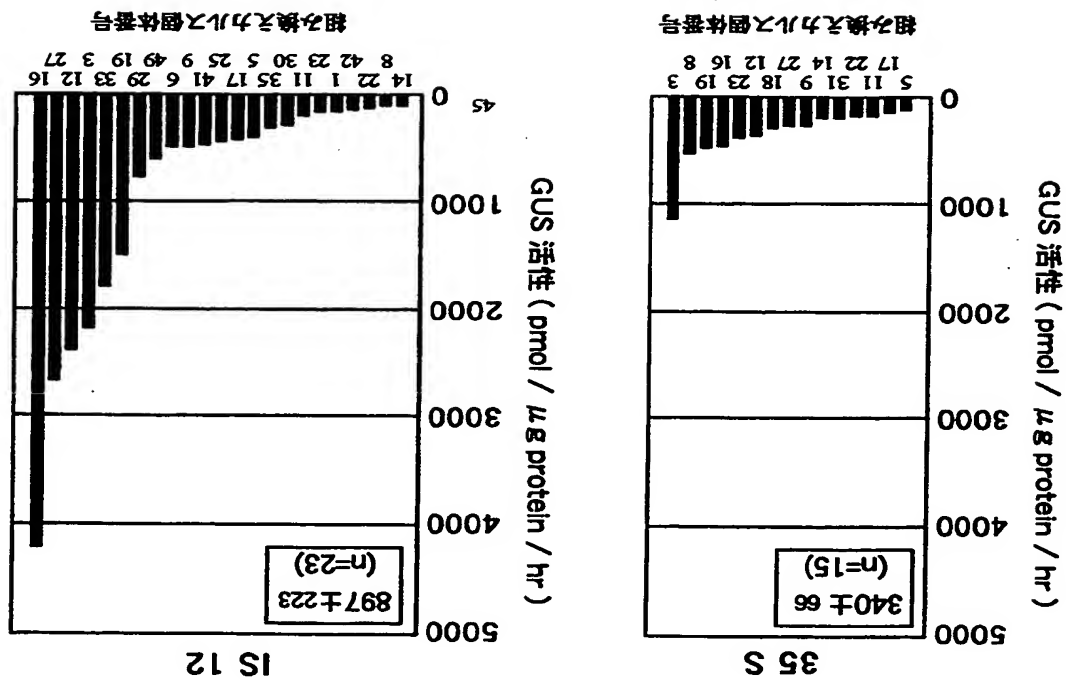
【図 12】

選択培地において IS1、IS2、IS12 及び 35S を導入した  
形質転換タバコ BY-2 培養細胞の再生カルス数の比較



【図 13】

35S および IS12 形質転換タバコ・カルアにおける GUS 活性の比較



【書類名】要約書

【要約】

【課題】転写活性化因子、特に位置効果によるジーン・サイレンシング(遺伝

子発現不活性化)現象を抑制する因子の提供。

【解決手段】1以上の可動性因子、特にMITF様因子を含む転写活性化因子。

下記(a)又は(b)のDNA:(a)配列番号1の塩基配列からなるDNA、

(b)(a)の塩基配列からなるDNAとストリンジেন্টな条件でハイブリダイ

イズし、かつ挿入位置において(A)<sub>n</sub>G(A)<sub>n</sub>[nは1以上の整数]の重複

を引き起こすMITF様因子をコードするDNA、及び/又は、下記(c)又は

(d)のDNA:(c)配列番号2の塩基配列からなるDNA、(d)(c)の

塩基配列からなるDNAとストリンジেন্টな条件でハイブリダイズし、かつ挿

入位置においてTAの重複を引き起こすMITF様因子をコードするDNAを有

する転写活性化因子。

【選択図】なし

出願人履歴情報

識別番号

[599101760]

1. 変更年月日

1999年 7月21日

[変更理由]

新規登録

住所

東京都東久留米市大門町2-3-6-302

氏名

小関 良宏

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000175283]

1. 変更年月日

1992年10月30日

[変更理由]

名称変更

住 所

大阪府豊中市三和町1丁目1番11号

氏 名

三榮源エフ・エフ・フイ株式会社